

# Aktivierung und Reprimierung der Gasvesikelbildung in *Haloferax mediterranei*

vom Fachbereich Biologie der  
Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades eines

*Doctor rerum naturalium*

genehmigte

DISSERTATION

vorgelegt von

Peter Zimmermann

aus Darmstadt

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. Felicitas Pfeifer  
Mikrobiologie, TU Darmstadt

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. Kathryn Nixdorff  
Mikrobiologie, TU Darmstadt

Eingereicht am: 11.02.2003

Tag der mündlichen Prüfung: 02.05.2003

Darmstadt 2003

D17

# Danksagung

Frau Prof. Dr. Felicitas Pfeifer danke ich ganz besonders für die Anregung zu dieser Arbeit, für die gute Betreuung, die vielen fruchtbaren Diskussionen und Denkanstöße, aber auch für die Freiheit, eigene Ideen entwickeln und umsetzen zu können.

Bei Herrn Prof. Dr. Jobst Gmeiner möchte ich mich bedanken, dass er immer mit Humor zur Stelle war, wenn es um das Beschaffen von Materialien und Chemikalien, um einen wissenschaftlichen Rat oder um die Lösung aller möglichen Probleme ging.

Meinen Freundinnen und Kolleginnen Dagmar Gregor und Annette Hofacker danke ich sehr für die vielen konstruktiven Diskussionen, für die großartige Freundschaft, die zwischen uns entstanden ist und dafür, dass sie immer für mich da waren und sind, wenn ich sie brauch(t)e.

Bei HD Dr. Arnulf Kletzin möchte ich mich besonders bedanken, dass er bei jedem Problem im Labor oder am Computer mit großer Geduld zuhört und mit großem Engagement immer einen Weg findet, dieses zu lösen. Bei HD Dr. Christa Schleper bedanke ich mich für die fachlichen Ratschläge und die stets engagierten fruchtbaren Diskussionen.

Den Diplomandinnen Kerstin Schmitz und Kerstin Castorph und meinen Kollegen Simone Sartorius-Neef, Petra Plößer, Erika Martusewitsch, Alexander Treusch, Melanie Jonuscheit, Torsten Ochsenreiter, Achim Quaiser, Tim Urich und Karin Lauber danke ich für das angenehme und kollegiale Arbeitsklima und für die gegenseitige Unterstützung.

Ein weiteres Dankeschön gilt unseren guten „Laborgeistern“ Bettina Basso, Renate Fröhlich, Silvia Haase und Gaby Liebing, mit denen die Zusammenarbeit stets angenehm war. Den beiden Spülchefs Cordula Bernhard und Nam-Suk Polin sowie den Sekretärinnen Karin Papalau und Irmi Ose-Kopetzky danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die große Unterstützung.

Den ehemaligen Diplomanden Brigitta Kurenbach und Jens Zotzel danke ich für die sehr angenehme und fruchtbare Zusammenarbeit im „Mediterranei-Team“.

Den Studentinnen Julia Flugel, Silvia Hehenwarter, Larissa Kerckhoff und Meike Schmedt danke ich für ihre engagierte Mitarbeit im Rahmen ihrer Forschungspraktika.

Ein ganz großes Dankeschön gilt meiner Familie, die mich immer unterstützt und mir immer wieder Mut gemacht hat.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>Einleitung</b>	<b>4</b>
Leben in hypersalinen Habitaten am Rande der Löslichkeit von NaCl	5
Phylogenie, Physiologie und Ökologie von Halobakterien	8
Gasvesikel	10
Gasvesikel-kodierende Genregionen bei Halobakterien und ihre Expression	12
Transkription und Transkriptionsregulation in Archaea	15
Regulation der Gasvesikelbildung	21
Ziel der Arbeit	25
<b>Material und Methoden</b>	<b>26</b>
Besondere Materialien und Chemikalien	26
Synthetische Oligonukleotide	27
Verwendete Organismen	28
Verwendete Plasmidvektoren	28
Anzucht von <i>E. coli</i>	28
Anzucht von <i>Haloferax mediterranei</i>	28
Anzucht von <i>Haloferax volcanii</i>	29
Herstellung von halobakteriellen Glycerinkulturen	29
Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
Molekularbiologische Standardtechniken	30
Transformation von <i>Hf. volcanii</i>	31
Konstrukte für die Transformation von <i>Hf. volcanii</i>	32
Plasmidisolierung aus <i>Hf. volcanii</i>	37
Sequenzbestimmung von DNA-Fragmenten	37
Nachweis von DNA-Fragmenten mittels Southern-Analyse	37
Isolierung halobakterieller RNA	38
Nachweis von RNA mittels Northern-Analyse	38
Isolierung von Proteinen aus Halobakterien für Western-Analysen	40
Isolierung von Proteinen aus <i>Hf. mediterranei</i> für <i>in vitro</i> -Studien	40
Proteinbestimmung nach Bradford	40

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	41
Nachweis halobakterieller Proteine mittels Western-Analyse . . . . .	41
Generierung von Antiseren . . . . .	42
Rekombinante Expression und Reinigung von Gvp-His-Fusionsproteinen aus <i>E. coli</i> . . . . .	43
Herstellung von Metall <sup>2+</sup> -NTA-Agarose-Matrices für die Reinigung von Gvp-His-Proteinen . . . . .	45
Affinitätschromatographie mit gebundenen Gvp-His-Proteinen für den Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen . . . . .	45
Affinitätschromatographie mit gebundenen Gvp-His-Proteinen für den Nachweis von ATP-/GTP-Bindefunktionen . . . . .	46
Hochauflösende Dünnschichtchromatographie . . . . .	46
β-Galaktosidase-Test . . . . .	47
<b>Ergebnisse . . . . .</b>	<b>48</b>
<b>1. Wachstumsphasenabhängige Regulation der Gasvesikelbildung . . . . .</b>	<b>48</b>
1.1. Anpassung von Medien für <i>Hf. volcanii</i> und <i>Hf. mediterranei</i> . . . . .	48
1.2. Untersuchung der Regulation des <i>gvpA</i> -Promotors mittels Northern-Analysen von <i>Hf. volcanii</i> -Transformanten . . . . .	51
1.2.1. Regulation des <i>mcA</i> -Promotors durch GvpD und GvpE . . . . .	52
1.2.2. Einfluß von GvpF, GvpG und GvpN in Verbindung mit GvpD und GvpE auf die Regulation des <i>mcA</i> - und des <i>mcD</i> -Promotors . . . . .	54
<b>2. Reinigung von mc-vac-Proteinen als His-tag-Fusionsproteine aus <i>E. coli</i> . . . . .</b>	<b>59</b>
<b>3. Zeitliches Auftreten von GvpD, GvpE und GvpF während des Wachstums von <i>Hf. mediterranei</i> . . . . .</b>	<b>63</b>
3.1. Test der Antiseren . . . . .	63
3.2. Western-Analysen zur Untersuchung des zeitlichen Auftretens von GvpD, GvpE und GvpF während des Wachstums von <i>Hf. mediterranei</i> . . . . .	65
3.3. Western-Analyse zur Untersuchung des zeitlichen Auftretens von GvpD während des Wachstums der <i>Hf. volcanii</i> -ADE-Transformante . . . . .	68
<b>4. Untersuchung der Regulation des <i>mcA</i>-Promotors mit dem Reportergen <i>bgaH</i> . . . . .</b>	<b>69</b>
4.1. Einfluß von GvpD, GvpE, GvpF und GvpG auf die Aktivierbarkeit des <i>mcA</i> -Promotors: Expression der Gene in pJAS35 unter <i>fdx</i> -Promotor-Kontrolle . . . . .	73
4.2. Regulation des <i>mcA</i> -Promotors durch GvpD, GvpE und GvpF: Expression der Gene unter der Kontrolle des <i>mcD</i> -Promotors . . . . .	80
4.3. Nachweis der Expression der <i>gvp</i> -Gene in den Transformanten auf Transkriptions- und Translationsebene . . . . .	85
4.3.1. Northern-Analysen zum Nachweis der Expression auf RNA-Ebene . . . . .	86

4.3.2. Western-Analysen zum Nachweis der Expression auf Proteinebene . . . . .	87
<b>5. Protein-Protein-Interaktionen zwischen Gvp-Proteinen aus der G-N-Region und Proteinen aus <i>Hf. mediterranei</i> . . . . .</b>	<b>92</b>
5.1. Identifizierung möglicher Bindungspartner der beiden Regulatoren GvpD und GvpE . . . . .	94
5.2. Identifizierung möglicher Bindungspartner von GvpF, GvpG, GvpC und GvpN . . . . .	97
<b>6. Charakterisierung von GvpD . . . . .</b>	<b>100</b>
6.1. Untersuchung von Mutanten von GvpD zur funktionellen Charakterisierung . .	100
6.1.1. Nachweis der GvpD <sub>mut</sub> -Proteine . . . . .	103
6.1.2. Auswirkungen der veränderten GvpD-Proteine auf die Regulation des mcA-Promotors . . . . .	104
6.2. Nachweis einer möglichen ATP-/GTP-Bindung von GvpD mittels Affinitätschromatographie/Dünnschichtchromatographie . . . . .	106
<b>Diskussion . . . . .</b>	<b>110</b>
<b>1. Untersuchungen zur Charakterisierung der Aktivierung und Reprimierung des mcA-Promotors durch GvpD und GvpE . . . . .</b>	<b>111</b>
1.1. Northern-Analysen von <i>Hf. volcanii</i> -Transformanten . . . . .	111
1.2. Reporteranalysen mit dem <i>bgaH</i> -Gen . . . . .	112
1.3. Zeitliches Auftreten von GvpD und GvpE während des Wachstums von <i>Hf. mediterranei</i> . . . . .	116
1.4. Protein-Protein-Interaktion zwischen GvpD und GvpE . . . . .	118
<b>2. Untersuchungen zur Charakterisierung des Einflusses von GvpF, GvpG und GvpN auf die Aktivierung und Reprimierung des mcA-Promotors . .</b>	<b>120</b>
2.1. Northern-Analysen von <i>Hf. volcanii</i> -Transformanten . . . . .	121
2.2. Reporteranalysen mit dem <i>bgaH</i> -Gen . . . . .	121
2.3. Zeitliches Auftreten von GvpF während des Wachstums von <i>Hf. mediterranei</i> .	123
2.4. Protein-Protein-Interaktionen mit GvpC, GvpF, GvpG und GvpN . . . . .	124
<b>3. Charakterisierung von GvpD . . . . .</b>	<b>124</b>
3.1. Untersuchung von Mutanten von GvpD . . . . .	124
3.2. Nachweis der möglichen ATP-/GTP-Bindung von GvpD . . . . .	126
<b>4. Abschließende Betrachtung . . . . .</b>	<b>127</b>
<b>Literaturverzeichnis . . . . .</b>	<b>129</b>
<b>Abkürzungen . . . . .</b>	<b>135</b>
<b>Anhang . . . . .</b>	<b>136</b>

# Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Aktivierung und Reprimierung der Gasvesikelbildung in dem halophilen Archaeon *Haloferax mediterranei* untersucht. *Hf. mediterranei* bildet nur in der stationären Wachstumsphase Gasvesikel, an deren Bildung 14 verschiedene *gvp*-Gene beteiligt sind, die in zwei entgegengesetzt orientierten Gengruppen liegen (*gvpACNO* und *gvpDEFGHIJKLM*) und unter der Kontrolle des *mcA*- und des *mcD*-Promotors stehen. Transkripte, die für die Strukturproteine kodieren, werden nur während der stationären Wachstumsphase gebildet und an dieser Regulation sind der Transkriptionsaktivator GvpE und das repressorisch wirkende GvpD beteiligt.

Northern-Analysen mit *Hf. volcanii*-Transformanten, die nur die Gene *gvpA*, *gvpD* und *gvpE* enthalten, zeigten, dass die Anwesenheit von GvpD nicht ausreichte, um die GvpE-abhängige Aktivierung des *mcA*-Promotors zu verhindern. Dies konnte nur durch eine starke Überexpression von *gvpD* unter *fdx*-Promotor-Kontrolle erreicht werden. Eine Reprimierung des *mcA*-Promotors bei Expression von *gvpD* unter der nativen Kontrolle konnte dagegen nur in Transformanten beobachtet werden, die zusätzlich *gvpF* oder *gvpN* zu *gvpADE* enthielten.

Mit dem Reportergen *bgaH*, das für ein halophiles Protein mit einer  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität kodiert, wurde der Einfluß von GvpD, GvpE und GvpF auf die Expression eines *mcA-bgaH*-Konstruktes in einer quantitativeren Weise analysiert. In verschiedenen Versuchsreihen wurde der Einfluß dieser Proteine auf die *mcA*-Promotor-abhängige Expression unter der nativen Kontrolle des *mcD*-Promotors oder unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors untersucht. Der Transkriptionsaktivator GvpE führte bereits in geringen Mengen bei Abwesenheit von GvpD immer zu sehr hohen *mcA*-Promotor-abhängigen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten. Nur unter der Kontrolle des *mcD*-Promotors exprimiertes *gvpD* und *gvpE* führte zu einer negativen Beeinflussung der GvpE-vermittelten Aktivierung des *mcA*-Promotors, während die gemeinsame Überexprimierung von *gvpDE* unter *fdx*-Promotor-Kontrolle zu keiner Repression des *mcA*-Promotors führte. Diese unterschiedlichen Ergebnisse waren vermutlich auf das größere nachgewiesene Verhältnis von GvpD zu GvpE in den Transformanten unter nativer Kontrolle zurückzuführen. Die zusätzliche Expression von *gvpF* führte dagegen nur bei gemeinsamer Überexprimierung von *gvpDEF* zu einer negativen Beeinflussung der GvpE-vermittelten Aktivierung des *mcA*-Promotors, wohingegen die GvpF-Menge bei nativer Kontrolle durch den *mcD*-Promotor in den entsprechenden *Hf. volcanii*-Transformanten zu gering war, um die GvpE-vermittelte Aktivierung des *mcA*-Promotors zu beeinflussen.

Für den Nachweis des zeitlichen Auftretens der Proteine GvpD, GvpE und GvpF während des Wachstums von *Hf. mediterranei* wurden Antiseren gegen die entsprechenden, rekombinant in *E. coli* produzierten und isolierten Proteine generiert. Die jeweiligen Antiseren detektierten GvpD und GvpE in der stationären Wachstumsphase, wohingegen GvpF vorwiegend in der exponentiellen Wachstumsphase nachgewiesen wurde.

Für die Charakterisierung der Funktion der drei genannten Proteine sowie der Proteine GvpC, GvpN und GvpG wurde mittels Protein-Protein-Affinitätschromatographie nach möglichen Bindungspartnern gesucht. Dafür wurden die entsprechenden, aus *E. coli* isolierten Gvp-His-Proteine koordinativ an eine Ni-NTA-Matrix gebunden und mit löslichen Proteinen aus *Hf. mediterranei* inkubiert. Mit der GvpD-His-Matrix konnte ein Protein mit der molekularen Masse von ca. 21 kDa gebunden werden, das mittels Western-Analyse als GvpE identifiziert wurde. Umgekehrt konnte mit der GvpE-His-Matrix GvpD aus löslichen Proteinen von *Hf. mediterranei* angereichert werden. Mit der GvpF-His-Matrix konnte mit einem GvpA-spezifischen Antiserum die Bindung von GvpA-Aggregaten nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse geben einen guten Hinweis darauf, dass GvpD und GvpE bzw. GvpF und GvpA auch in *vivo* miteinander interagieren.

In weiteren Analysen konnte mit *Hf. volcanii*-Transformanten, die veränderte Varianten von GvpD (GvpD<sub>mut</sub>-Proteine) produzierten, gezeigt werden, dass ein *p-loop*-Motiv (mögliches ATP-/GTP-Bindemotiv) sowie zwei basische Regionen in der Aminosäuresequenz von GvpD wichtig für die Reprimierung der GvpE-vermittelten Aktivierung des mcA-Promotors sind. Untersuchungen mit gereinigtem GvpD-His zeigten, dass das Protein ATP aus einem ATP-haltigen Puffer binden konnte.

Ein Teil der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

**Pfeifer F, Zotzel J, Kurenbach B, Röder R, Zimmermann P (2001).** A p-loop motif and two basic regions in the regulatory protein GvpD are important for the repression of gas vesicle formation in the archaeon *Haloferax mediterranei*. *Microbiology* 147: 63-73

**Pfeifer F, Gregor D, Hofacker A, Plöber P, Zimmermann P (2002).** Regulation of Gas Vesicle Formation in Halophilic Archaea. *J Mol Microbiol Biotechnol* 4: 175-181

**Zimmermann P & Pfeifer F (2003).** Regulation of the expression of gas vesicle genes in *Haloferax mediterranei*: interaction of the two regulatory proteins GvpD and GvpE, eingereicht.



# Einleitung

Der Besiedlung von Lebensräumen durch Mikroorganismen wird durch die Salzkonzentration keine Grenzen gesetzt. Von Süßwasser-Habitaten bis zu hypersalinen Umgebungen wie Salzseen, dem Toten Meer oder Meersalzgewinnungsanlagen, bei denen jeweils Salzkonzentrationen bis zur Sättigung vorkommen, ist Leben möglich. Sogar in Salzkristallen können halophile Mikroorganismen überdauern und nach Millionen von Jahren lebend aus diesen isoliert und kultiviert werden (Grant *et al.*, 1998). Viele hypersaline Habitate entstehen durch Verdunstung von Meerwasser. Die Salzzusammensetzungen dieser Umgebungen sind daher ähnlich wie die Zusammensetzung von Meerwasser. Die dominierenden Kationen sind  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$ , die dominierenden Anionen sind  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  und  $\text{CO}_3^{2-}$ . Bei fortschreitender Verdunstung ändert sich die Zusammensetzung geringfügig, da  $\text{CaCO}_3$  und  $\text{CaSO}_4$  aufgrund ihrer geringeren Löslichkeitsprodukte präzipitieren.

Vertreter aus allen drei Domänen des Lebens, Archaea, Bakteria und Eukarya, sind in extrem salzhaltigen Lebensräumen anzutreffen. Die Eukaryonten sind fast einzig durch verschiedene Arten der Grünalge *Dunaliella* vertreten, die in vielen hypersalinen Lebensräumen die wichtigsten oder sogar die einzigen Primärproduzenten darstellen. *Dunaliella*-Arten können in einem weiten Bereich verschiedener Salzkonzentrationen vorkommen und wachsen auch noch bis 5 M NaCl (29%).

Die Domäne der Bakterien enthält viele halotolerante Mikroorganismen, die in verschiedenen Subgruppen neben nicht-halotoleranten Arten vorkommen (Ventosa *et al.*, 1998). So enthalten beispielsweise die  $\gamma$ -Gruppe der Proteobakterien, die Cyanobakterien, die Flavobakterien, die Actinomyceten und die Gattungen *Bacillus* und *Clostridium* halotolerante Vertreter. Bis auf wenige Ausnahmen wie *Halorhodospira*, *Actinopolyspora* und „*Candidatus Salinibacter*“ sind die meisten halophilen Bakterien eher halotolerant als extrem halophil und kommen auch in Habitaten mit niedrigeren Salzkonzentrationen vor.

Zu den halophilen Archaea gehört die Familie Halobacteriaceae, deren Vertreter alle halophile Organismen sind und Salzkonzentrationen von mindestens 1,5 M NaCl (9%) zum Überleben benötigen sowie einige Methanogene (*Methanohalobium*, *Methanohalophilus*). Die meisten Vertreter der Halobacteriaceae wachsen optimal bei Salzkonzentrationen von 3,5 bis 4,5 M NaCl (21 bis 26%) und können auch noch in einer gesättigten Lösung mit 5,2 M NaCl (30%) wachsen. Der Begriff „Halophilie“ stammt aus dem Altgriechischen und bedeutet übertragen „Die Liebe zum Salz“. Halophilie beschreibt dabei sehr treffend den Umstand,

dass halophile Organismen nicht nur an ein Leben in einer Umgebung mit hohen Salzkonzentrationen angepasst sind, sondern hohe Salzkonzentrationen zum Überleben benötigen. Die Halobacteriaceae sind damit die halophilen Organismen *par excellence* und werden in hypersalinen Lebensräumen zusammen mit der Grünalge *Dunaliella* zur dominierenden Population, wenn die Salzkonzentration 2,5 M NaCl überschreitet (Grant & Larson, 1989).

## Leben in hypersalinen Habitaten am Rande der Löslichkeit von NaCl

Da biologische Membranen permeabel für Wasser sind, müssen alle Organismen ihr Cytoplasma mindestens isoosmotisch zur Umgebung halten, um nicht durch den osmotischen Druck der Umgebung Wasser zu verlieren. Für Mikroorganismen in hypersalinen Biotopen bedeutet dies, dass sie ihr Cytoplasma isoosmotisch zu einem Aussenmedium halten müssen, das 1,5 bis 5,2 M NaCl enthält.

Hohe intrazelluläre Salzkonzentrationen sind normalerweise für Organismen nicht möglich, da dies Proteine und Makromoleküle zerstören würde. Hohe intrazelluläre Salzkonzentrationen führen zur Dehydratisierung von Proteinen, wodurch deren Hydrophobizität drastisch erhöht wird. Dies verursacht den Verlust der strukturellen Integrität der Proteine und führt zur Aggregation von Proteinen aufgrund der energetisch stark favorisierten Ausbildung hydrophober Interaktionen. Die erhöhte Anzahl von intrazellulären Ladungsträgern stört ausserdem elektrostatische Wechselwirkungen zwischen und innerhalb von Makromolekülen, und die Hydratisierung der Ionen reduziert drastisch die Verfügbarkeit von Wasser für biologische Reaktionen.

Für die Besiedlung hypersaliner Lebensräume haben Mikroorganismen zwei unterschiedliche Strategien entwickelt, ihr Cytoplasma isoosmotisch zum Aussenmedium zu halten, ohne dass die intrazellulären biologischen Prozesse durch hohe Salzkonzentrationen inhibiert werden.

Bei der sogenannten *compatible solutes*-Strategie werden intrazellulär große Mengen kleiner organischer Moleküle angereichert, um den osmotischen Druck des Aussenmediums auszugleichen. *Compatible solutes* werden definiert als lösliche niedermolekulare Substanzen, die selbst in hohen intrazellulären Konzentrationen eine effiziente Funktion der Enzyme erlauben (Brown, 1990). *Compatible solutes* sind typischerweise kleine organische Moleküle, die in hohen Konzentrationen in Wasser löslich sind und bei physiologischem pH-Wert ungeladen oder zwitterionisch vorliegen. Einige typische *compatible solutes* sind Glycerin, Zucker- und Zuckerderivate sowie Aminosäuren und deren Derivate wie z. B. Glycinbetain und Ektoin (Madigan & Oren, 1999; Oren, 1999). Die Verwendung von *compatible solutes* ist

allerdings für die entsprechenden Organismen eine kostspielige Angelegenheit, da sie sehr viel Energie für die Synthese der großen intrazellulären Mengen dieser Substanzen aufbringen müssen. Bei sehr großen Salzkonzentrationen im Aussenmedium ist diese Strategie daher für Organismen, die nicht autotroph leben, energetisch zu ungünstig (Dennis & Shimmin, 1997; Oren, 1999). Die *compatible solutes*-Strategie wird hauptsächlich von *Dunaliella*, den meisten halotoleranten Bakterien und einigen halophilen methanogenen Archaea benutzt. Halophile Archaea der Familie Halobacteriaceae produzieren hingegen keine *compatible solutes*.

Bei der *salt-in*-Strategie werden hingegen im Cytoplasma tatsächlich Salzkonzentrationen erreicht, die mit dem Aussenmedium isoosmotisch sind (Madigan & Oren, 1999; Oren, 1999). Diese Strategie wird von den halophilen Archaea und halophilen Bakterien der Ordnung Haloanaerobiales verfolgt. Im Gegensatz zum Aussenmedium, das vorwiegend NaCl enthält, wird bei der *salt-in*-Strategie im Zellinneren vorwiegend KCl angereichert (Dennis & Shimmin, 1997). Das extrem halophile Archaeon *Halobacterium salinarum* (*Hb. salinarum*) enthält z. B. im Cytoplasma 4 M KCl und 1 M NaCl. Aus den oben angeführten Gründen müssen sich halophile Proteine von nicht-halophilen Proteinen unterscheiden, um ihre Struktur und Funktion in einer Umgebung mit bis zu 5 M Salz aufrechterhalten zu können. Die Evolution hat daher halophile Proteine in ihrer Struktur und ihren chemischen Eigenschaften so angepasst, dass sie bei hohen Salzkonzentrationen aktiv sind. Die Veränderung zu halophilen Proteinen ging dabei so weit, dass diese Proteine in der Regel hohe Salzkonzentrationen brauchen, um ihre Struktur aufrechterhalten und ihre Funktion erfüllen zu können.

Was macht ein Protein zu einem halophilen Protein? Halophile Proteine besitzen im Vergleich zu nicht-halophilen Proteinen einen hohen Anteil von Aminosäuren mit sauren Seitenketten (Glutaminsäure und Asparaginsäure) und einen geringeren Anteil von Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten (Lanyi, 1974; Dennis & Shimmin, 1997; Oren, 1999). Da die Seitenketten von Glutaminsäure und Asparaginsäure bei physiologischem pH-Wert deprotoniert und damit negativ geladen sind, besitzen halophile Proteine sehr viele negative Ladungen. Die Aminosäuren mit sauren Seitenketten sind zudem vorwiegend auf der Oberfläche halophiler Proteine positioniert, wodurch sie dem Protein eine stark negativ geladene Oberfläche verleihen. Dies ermöglicht halophilen Proteinen, eine feste Hydrathülle zu binden und macht sie unempfindlicher gegen den dehydratisierenden Effekt hoher Salzkonzentrationen in der Umgebung (Lanyi, 1974; Eisenberg, 1992; Frolov *et al.*, 1996). Die Aufrechterhaltung der Hydrathülle durch Konzentrierung vieler negativer Ladungen auf der Proteinoberfläche und die Reduktion an hydrophoben Seitenketten verhindert die Aggregation der Proteine bei hohen Salzkonzentrationen (Aussalz-Effekt). Des weiteren sind die negativ geladenen

Aminosäureseitenketten an der Oberfläche vermutlich in der Lage, die Organisation eines hydratisierten Ionennetzwerkes mit  $K^+$ - oder  $Na^+$ -Ionen als Gegenionen zu koordinieren. Im Inneren halophiler Proteine sind viele negative Ladungen saurer Seitenketten mit positiven Ladungen basischer Seitenketten von Arginin und Lysin assoziiert und bilden ein umfangreiches System aus Salzbrücken, das zur Stabilität der dreidimensionalen Struktur des Proteins beiträgt (Dym *et al.*, 1995).

Vergleicht man Gene, die für halophile Proteine kodieren, mit den homologen Genen aus nicht-halophilen Bakterien, so stellt man fest, dass die Gene halophiler Organismen zwei bis drei Mal mehr nicht-synonyme Nukleotidsubstitutionen wie die entsprechenden bakteriellen Gene erfahren haben. Es wird vermutet, dass diese Substitutionen, die in Aminosäureaustauschen resultierten, einen Einfluß auf die Hydrophobizität und die Hydratisierung der Oberfläche halophiler Proteine haben (Dennis & Shimmin, 1997).

Wie bereits erwähnt, akkumulieren Halobakterien  $K^+$  statt  $Na^+$  im Zellinneren. Da  $Na^+$  kleiner als  $K^+$  ist und damit eine höhere Ladungsdichte als  $K^+$  besitzt, nimmt  $Na^+$  auch eine größere Hydrathülle als  $K^+$  in Anspruch. Dies bedeutet, dass eine bestimmte Menge an  $Na^+$ -Ionen mehr  $H_2O$ -Moleküle bindet als die gleiche Menge an  $K^+$ -Ionen. Für die Verfügbarkeit von  $H_2O$ -Molekülen für intrazelluläre Prozesse und für die Ausbildung der Hydrathüllen der Proteine ist daher  $K^+$  günstiger als  $Na^+$  und wird wahrscheinlich deshalb intrazellulär bevorzugt. Die Akkumulierung hoher intrazellulärer KCl-Konzentrationen erfordert die Aufnahme von  $K^+$ - und  $Cl^-$ -Ionen sowie das Ausschleusen von  $Na^+$ -Ionen. In *Halobacterium* wird  $K^+$  vermutlich durch ein Uniport-System energieunabhängig entsprechend dem Membranpotential aufgenommen (Wagner *et al.*, 1978). In *Haloferax* geschieht die Aufnahme von  $K^+$  durch einen energieabhängigen aktiven Transport (Meury & Kohiyama, 1989). Der Transport von  $Cl^-$  in das Zellinnere geschieht vermutlich durch ein Symport-System zusammen mit  $Na^+$  (Duschl & Wagner, 1986). Das Ausschleusen der  $Na^+$ -Ionen geschieht in einem Antiport mit dem gleichzeitigen Import von einem Proton pro  $Na^+$ . Dabei wird der über die Zellmembran aufgebaute Protonengradient ausgenutzt. Der Aufbau des Protonengradienten geschieht durch die Prozesse der Atmungskette, das Ausschleusen von Protonen durch die membrangebundene A-Typ-ATPase auf Kosten von ATP-Hydrolyse, bzw. falls vorhanden, durch die lichtgetriebene Aktivität von Bakteriorhodopsin. Da der Aufbau des Protonengradienten Energie benötigt, ist das Ausschleusen von  $Na^+$  durch Protonenantiport somit ein energieabhängiger Prozess.

Im Vergleich zu der *compatible solutes*-Strategie ist die *salt-in*-Strategie aus energetischen Gesichtspunkten eine wesentlich vorteilhaftere Alternative für die Anpassung an hohe

Salzkonzentrationen. Energetische Berechnungen erbrachten, dass bei der *salt-in*-Strategie für die Akkumulierung von einem Mol KCl 0,5 bis 0,67 Mol ATP benötigt werden, wohingegen bei der *compatible solutes*-Strategie für die Synthese von 2 Mol eines bestimmten Moleküls der *compatible solutes* für den isoosmolarischen Ausgleich von einem Mol NaCl zwischen 46 und 218 Mol ATP benötigt werden (Dennis & Shimmin, 1997).

## Phylogenie, Physiologie und Ökologie von Halobakterien

Die Halobakterien werden phylogenetisch in die Ordnung der Halobacteriales eingeordnet, die nur eine einzige Familie enthält, die Halobacteriaceae. Innerhalb der Halobacteriaceae wurden bisher 18 Gattungen beschrieben, die physiologisch in zwei Gruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe beinhaltet Isolate, die bei nahezu neutralem pH-Wert (pH 5 bis 8) wachsen und neben NaCl auch mindestens 5 mM  $Mg^{2+}$  benötigen. Zu dieser Gruppe gehören z. B. *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halobaculum*, *Halococcus* und *Haloferax*. Die zweite Gruppe beinhaltet haloalkaliphile Isolate, die bei alkalischen pH-Werten (pH 8,5 bis 11,0) optimal wachsen und geringere  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen (<1 mM) benötigen. Zu letzteren zählen z. B. die Gattungen *Halorubrum*, *Natrialba*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natronomonas* und *Natronorubrum* (Grant & Larson, 1989; Kamekura, 1998).

Die meisten Halobakterien betreiben einen strikt aeroben, chemoorganotrophen Stoffwechsel, es gibt jedoch auch einige fakultativ anaerobe Isolate, die Arginin fermentieren oder eine anaerobe Atmung mit Nitrat oder Fumarat als terminalen Elektronenakzeptoren durchführen (Oren, 1994).

Wie bereits erwähnt, sind Halobakterien immer dort anzutreffen, wo sehr hohe Salzkonzentrationen vorherrschen. Ihre natürlichen Habitate sind daher Salzseen, das Tote Meer, und Meersalzgewinnungsanlagen, in denen hypersaline Bedingungen herrschen. Entsprechend den Salzkonzentrationen in den dort vorherrschenden Biotopen lassen sich die Halobakterien weiterhin in moderat Halophile und extrem Halophile unterscheiden. Die moderat halophilen Spezies *Haloferax mediterranei* (*Hf. mediterranei*) und *Hf. volcanii* wachsen z. B. optimal bei einer Salzkonzentration von 2,5 bis 3 M NaCl und 0,2 M  $Mg^{2+}$ , wachsen aber auch noch gut bei NaCl-Konzentrationen bis 4,5 M und  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen bis 1,5 M. Die extrem halophilen Archaea z. B. der Gattung *Halobacterium* brauchen hingegen 3,5 bis 5,2 M NaCl für ihr Wachstum, begnügen sich aber mit einem Minimum von mindestens 0,005  $Mg^{2+}$ . Höhere  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen als 0,5 M wirken sich bei den meisten *Halobacterium*-Spezies im Gegensatz zu den *Haloferax*-Arten negativ auf das Wachstum aus (Rodriguez-Valera, 1983; Grant & Larson, 1989; Tindall, 1992).

In den hypersalinen Lebensräumen erreichen die Halobakterien oft sehr hohe Populationsdichten bis zu  $10^8$  Zellen pro ml. Die Halobakterien-Populationen sind dann aufgrund der rötlichen Pigmentierung sehr gut mit bloßem Auge zu erkennen. Die rot-orangene Farbe der Halobakterien ist auf die Produktion von  $C_{40}$ -Carotinoiden wie Lycopine und  $C_{50}$ -Carotinoiden wie Bakterioruberine zurückzuführen, die die Halobakterien zum Schutz vor photooxidativen Schäden bei starker Sonneneinstrahlung an den Oberflächen ihrer wässrigen Habitate in ihre Membranen einlagern (Grant & Larson, 1989; Oren, 2002). Auch die Grünalge *Dunaliella* bildet Carotinoide zum Schutz gegen die Sonneneinstrahlung, weshalb *Dunaliella*-Arten auch industriell für die Isolierung von Carotinoiden benutzt werden. Einige Halobakterien lagern in ihre Membranen auch große Mengen des Retinalproteins Bakteriorhodopsin ein. Dieses Protein kann mit Hilfe des kovalent mit einem Lysinrest verknüpften Retinals Lichtenergie absorbieren und für den Export von Protonen aus der Zelle nutzen und damit in chemische Energie umwandeln. Bakteriorhodopsin wirkt somit als lichtgetriebene Protonenpumpe und baut alternativ zu den Komponenten der Atmungskette einen Protonengradienten über die Membran auf, der für die Generierung von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat mittels der in der Membran lokalisierten A-Typ ATPase oder auch für das Ausschleusen von  $Na^+$  mit dem  $Na^+/H^+$ -Antiport-System (s. o.) genutzt werden kann.

Eine weitere Besonderheit der Halobakterien ist auch ihre Formenvielfalt. Unter den halophilen Archaea gibt es Stäbchen (z. B. *Halobacterium*), Kokken (z. B. *Halococcus*), dreieckige und quadratische Plättchen (z. B. *Haloarcula*) und diskusförmige Zellen (z. B. *Haloferax*). Viele der Halobakterien sind pleomorph und bilden abhängig von der Wachstumsphase und dem umgebenden Medium verschiedene der oben beschriebenen Zellformen aus (z. B. *Haloarcula* und *Haloferax*) (Grant & Larson, 1989; Tindall, 1992). Die Flexibilität in der Zellform der Halobakterien dient vermutlich der Optimierung der Sauerstoffaufnahme, indem das Verhältnis von Zelloberfläche zu Zellvolumen verändert werden kann (Norton, 1992). Hypersaline Habitate haben oft sehr niedrige Sauerstoffkonzentration, da die Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser mit steigender Salzkonzentration abnimmt. Bei fortschreitender Erwärmung der Gewässer wird dies noch verstärkt: Die Menge an gelöstem Sauerstoff nimmt bei steigender Temperatur ab, ausserdem nimmt die Verdunstung und damit die Salzkonzentration noch weiter zu.

Die günstigsten Sauerstoffkonzentrationen für einen aeroben Stoffwechsel sind unter diesen Bedingungen dann an oder nahe der Gewässeroberfläche. Um in den hypersalinen Gewässern an die Oberfläche zu gelangen, wo Licht und Sauerstoff ausreichend verfügbar

sind, haben einige Halobakterien zusätzlich die Fähigkeit, Gasvesikel zu bilden und ihre Schwebdichte in den Gewässern so zu verringern, dass sie an die Oberfläche gelangen.

## Gasvesikel

Gasvesikel sind wasserundurchlässige, gasgefüllte, intrazellulär gebildete Hohlkörper, die nur aus Protein aufgebaut sind und bestimmten aquatischen Organismen erlauben, in ihrem wässrigen Lebensraum an die Oberfläche zu flotieren. Zur Bildung von Gasvesikeln sind viele Cyanobakterien wie z. B. *Anabaena* und *Nostoc*, das Gram-negative Bakterium *Ancylobacter aquaticus*, das methanogene Archaeon *Methanosarcina barkeri* sowie die halophilen Archaea *Hb. salinarum*, *Hf. mediterranei* und *Halorubrum vacuolatum* befähigt (Stoeckenius & Kunau, 1968; Englert *et al.*, 1990; Mwatha & Grant, 1993; Walsby, 1994). Da Gasvesikel stark lichtbrechende Eigenschaften besitzen, kann ihre Bildung bereits mit Hilfe des Lichtmikroskops nachgewiesen werden, wo sie als kleine, hell leuchtende Bereiche innerhalb der Zellen erscheinen. Die Bildung der Gasvesikel verleiht den ansonsten durch die Produktion von Lycopinen und Bakterioruberinen rötlich gefärbten Halobakterien eine hellrosa bis weißliche Farbe auf Agarplatten und in stationär gewachsenen Flüssigkulturen. Neben der Möglichkeit, durch die Bildung von Gasvesikeln flotieren zu können, wird auch eine Schutzfunktion vor photooxidativen Schäden an der starkem Sonnenlicht ausgesetzten Oberfläche der aquatischen Lebensräume postuliert (Shear & Walsby, 1975). Die Bildung der Gasvesikel verkleinert auch das Verhältnis von Cytoplasmavolumen zu Zelloberfläche und verbessert dadurch mit Sicherheit die Sauerstoffversorgung der Zellen unter den bereits diskutierten Sauerstoff-limitierenden Bedingungen in hypersalinen Habitaten.

Die Gasvesikel der Cyanobakterien haben eine zylindrische Form mit konischen Enden und besitzen einen Durchmesser von 45 bis 120 nm und eine Länge von 100 bis 800 nm (Walsby & Hayes, 1989; Walsby, 1994). Die Gasvesikel der Halobakterien sind in der Regel größer und können zylindrische oder zitronenförmige Formen ausbilden. Die zylindrischen Gasvesikel haben einen Durchmesser von 200 nm und eine Länge von 600 bis 1500 nm, die zitronenförmigen Gasvesikel haben einen ähnlichen Durchmesser, erreichen aber nur Längen von 200 bis 250 nm (Stoeckenius & Kunau, 1968; Simon, 1981; Englert *et al.*, 1990).

Die Gasvesikelhülle ist nur aus Proteinen aufgebaut und bildet eine im Elektronenmikroskop sichtbare Rippenstruktur aus, wobei die Rippen senkrecht zur Längsachse angeordnet sind. Die Gasvesikelhülle ist undurchlässig für Wasser, aber frei permeabel für Gase, wobei es nicht zu einer selektiven Anreicherung bestimmter Gase kommt.

Das Hauptstrukturprotein der Gasvesikelhülle ist das 7 bis 8 kDa große hydrophobe GvpA, das 95% des gesamten Gasvesikelproteingehalts ausmacht und durch polymere helikale Assemblierung die Rippenstruktur bedingt (Walsby, 1994; Offner *et al.*, 1998). Die Aminosäuresequenz der GvpA-Proteine ist sehr stark konserviert. Bei den Gasvesikel-produzierenden Halobakterien ist der Unterschied in der 75 bis 78 Aminosäuren langen Sequenz auf nur 3 bis 6 Positionen begrenzt, was sich in einer Sequenzähnlichkeit von 94% äußert (Englert *et al.*, 1990).

Neben dem Hauptstrukturprotein GvpA ist noch ein weiteres Protein an der Struktur der Gasvesikelhülle beteiligt, das bei Halobakterien 31 bis 42 kDa große hydrophile GvpC. Bei dem Cyanobakterium *Anabaena* konnte gezeigt werden, dass GvpC aussen auf den Gasvesikeln in einem Verhältnis von 1:25 zu GvpA aufgelagert ist und zur Stabilität der Gasvesikelstruktur gegenüber Druck verantwortlich ist (Hayes *et al.*, 1992; Buchholz *et al.*, 1993). Bei Halobakterien konnte ebenfalls gezeigt werden, dass GvpC mit der Gasvesikelhülle assoziiert ist und für die richtige Größe des zylindrischen Mittelteils der Gasvesikel eine Rolle spielt, wodurch hier auch indirekt die Druckstabilität bedingt wird (Englert & Pfeifer, 1993; Offner *et al.*, 1996). Die GvpC-Proteine der Halobakterien sind weit weniger stark konserviert als die GvpA-Proteine, weisen aber als Gemeinsamkeit eine siebenfache interne Sequenzwiederholung von 25 bis 38 Aminosäuren auf. Jede dieser Sequenzwiederholung bildet vermutlich eine helikale Struktur aus, die lang genug wäre, um mit 5 GvpA-Molekülen einer Gasvesikel-Rippe zu interagieren. Die nächste Sequenzwiederholung könnte dann 5 weitere GvpA-Moleküle der nächsten Rippe binden. Da GvpC in *Anabaena* 5 dieser Sequenzwiederholungen besitzt, könnte so das Verhältnis von 1:25 von GvpC zu GvpA in *Anabaena* erklärt werden (Walsby, 1994). Die Analyse verschiedener *gvpC*-Mutanten zeigte, dass die Formgebung der zitronenförmigen und zylindrischen Gasvesikel abhängig von der Anwesenheit von GvpC und im speziellen von den Sequenzwiederholungen innerhalb von GvpC ist (Offner *et al.*, 1996; Best, 2000). Allerdings hat die Sequenz des Gasvesikelhauptproteins GvpA auch einen wesentlichen Einfluß auf die Ausbildung der Gasvesikelform und die Stabilität der Gasvesikel (Beard *et al.*, 2002).

Eine genauere strukturelle Analyse der Gasvesikelkomponenten und die Identifizierung weiterer, an die Gasvesikelhülle assoziierter Proteine gelang bisher nicht, da sich die Gasvesikelhülle als sehr resistent gegenüber den üblichen biochemischen Methoden zeigte und GvpA-Moleküle nicht in ihrer monomeren Form isoliert werden konnten, ohne dabei denaturiert zu werden. Röntgenstrukturanalysen mit kollabierten Gasvesikeln erbrachten



jedoch Hinweise darauf, dass GvpA vermutlich aus einem ausgedehnten System aus anti-parallelen  $\beta$ -Faltblattstrukturen besteht (Walsby, 1994).

## Gasvesikel-kodierende Genregionen bei Halobakterien und ihre Expression

Bei der Gasvesikelbildung in den halophilen Archaea *Hb. salinarum* und *Hf. mediterranei* sind vierzehn verschiedene *gvp*-Gene (*gas vesicle protein coding genes*) beteiligt, die in ca. 9 kb großen sogenannten *vac*-Regionen (*gas vacuole coding regions*) in zwei entgegengesetzt orientierten Gengruppen (*gvpACNO* und *gvpDEFGHIJKLM*) angeordnet sind (Abb. 1) (Horne *et al.*, 1988; Horne *et al.*, 1991; Englert *et al.*, 1992a). *Hb. salinarum* PHH1 besitzt zwei verschiedene *vac*-Regionen: Die auf dem 150 kb großen Plasmid pHH1 lokalisierte p-*vac*-Region sowie die chromosomal kodierte c-*vac*-Region. In dem Stamm PHH1 werden Gasvesikel allerdings nur ausgehend von den Genen der p-*vac*-Region gebildet. Bei *Hb. salinarum* PHH4 fehlt die gesamte p-*vac*-Region auf dem Plasmid pHH4, und bei diesem Stamm erfolgt die Gasvesikelbildung von der c-*vac*-Region (Horne *et al.*, 1988; Horne *et al.*, 1991; Englert *et al.*, 1992a). In der Genomsequenz von *Halobacterium sp.* NRC-1 befinden sich insgesamt drei *vac*-Regionen: Die Genregion *gvpI* ist auf dem 191 kb großen Plasmid pNRC100 lokalisiert und nahezu identisch mit der p-*vac*-Region (Jones *et al.*, 1991; DasSarma *et al.*, 1994; Ng *et al.*, 1998). Auf dem 365 kb großen Plasmid pNRC200 befindet sich eine weitere Kopie der *gvpI*-Region innerhalb einer 145 kb großen, mit pNRC100 identischen Region sowie eine weitere *vac*-Region, die Genregion *gvp2*, die nahezu identisch mit der c-*vac*-Region ist, der aber das *gvpM*-Gen fehlt (Ng *et al.*, 2000). *Halobacterium sp.* NRC-1 ist ein nah verwandter Stamm zu *Hb. salinarum* PHH1. Da die genauen Verwandtschaftsverhältnisse zu den anderen *Halobacterium*-Spezies jedoch nicht vollständig geklärt werden konnten, wurde dieser Stamm als *Halobacterium sp.* NRC-1 bezeichnet.

Der nah verwandte, moderat halophile *Haloferax mediterranei* besitzt eine chromosomal kodierte *vac*-Region, die als mc-*vac*-Region (*Hf. mediterranei* chromosomal) bezeichnet wurde (Abb. 1) und deren Gene identisch wie diejenigen der p-*vac*- und c-*vac*-Regionen angeordnet sind, aber von der Gensequenz eine größere Verwandtschaft zu den Genen der p-*vac*-Region zeigen (Horne *et al.*, 1991; Englert *et al.*, 1992a).

Die Gasvesikelbildung in *Halorubrum vacuolatum* (früher *Natronobacterium vacuolatum*) wird von der nv-*vac*-Region kodiert und besteht aus einer einzigen Genregion mit *gvpACNOFGHIJKLM*, der die beiden Gene *gvpD* und *gvpE* fehlen (Mayr & Pfeifer, 1997; Pfeifer *et al.*, 1997).

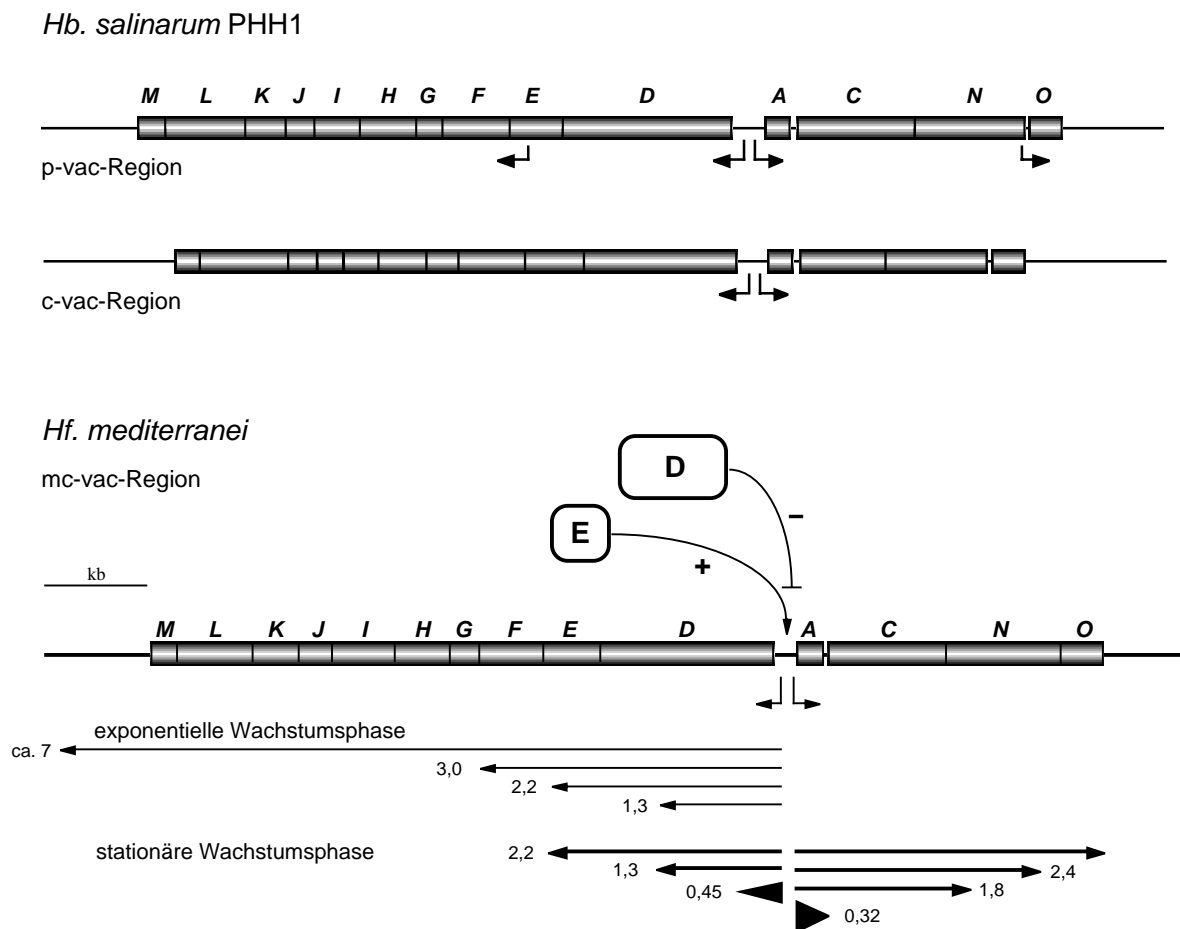
Die Gasvesikel, die ausgehend von den drei sehr ähnlichen halobakteriellen vac-Regionen p-vac, c-vac und mc-vac kodiert werden, unterscheiden sich in ihrer Form und in der wachstumsphasenabhängigen Bildung. Während die Expression der p-vac-Region zur konstitutiven Bildung von zitronenförmigen Gasvesikeln führt, resultiert die Expression der c-vac-Region in der Bildung von zylindrischen Gasvesikeln, die erst ab dem Eintritt der Kulturen in die stationäre Wachstumsphase gebildet werden (Horne & Pfeifer, 1989). Die Gasvesikel bei *Hf. mediterranei* besitzen ebenfalls eine zylindrische Form und werden auch nur in der stationären Wachstumsphase gebildet. Des weiteren erfolgt die Gasvesikelbildung bei *Hf. mediterranei* nur dann, wenn die Salzkonzentration im Medium mindestens 17% beträgt. Kulturen, die bei 15% Salz angezogen wurden, bilden während dem gesamten Wachstum hindurch keine Gasvesikel (Rodriguez-Valera *et al.*, 1983; Englert *et al.*, 1990).

Die Expression der 14 *gvp*-Gene wird in der c-vac- und in der mc-vac-Region von zwei Promotoren vor den Genen *gvpA* und *gvpD* gesteuert (Abb. 1). In der p-vac-Region sind zwei zusätzliche Promotoren vor den Genen *gvpF* und *gvpO* vorhanden (Horne & Pfeifer, 1989; Englert *et al.*, 1992a; Offner & Pfeifer, 1995; Offner *et al.*, 1996).

Die Expression der 9,4 kb großen mc-vac-Region durch die beiden Promotoren vor mc-*gvpA* (mcA-Promotor) und mc-*gvpD* (mcD-Promotor) führt zu einem komplexen Transkriptionsmuster (Englert *et al.*, 1992a; Röder & Pfeifer, 1996): Während der exponentiellen Wachstumsphase sind vom mcD-Promotor aus ein ca. 7 kb großes Transkript, das die Gene mc-*gvpDEFGHIJKLM* überstreicht, ein 3,0 kb großes Transkript mit mc-*gvpDEF*, ein 2,2 kb großes Transkript mit mc-*gvpDE* sowie ein 1,3 kb großes Transkript, das einen Teil von mc-*gvpD* enthält, nachweisbar. Während der exponentiellen Wachstumsphase sind vom mcA-Promotor aus gebildete Transkripte nicht oder nur in sehr geringer Menge nachweisbar. Dadurch können in der exponentiellen Wachstumsphase die Gasvesikel-Strukturproteine GvpA und GvpC nicht gebildet und somit auch keine Gasvesikel produziert werden. In der stationären Wachstumsphase sind vom mcD-Promotor aus nur noch die 2,2 kb und die 1,3 kb großen Transkripte nachweisbar, sowie ein weiteres, 0,45 kb großes Transkript mit dem 5'-Teil von mc-*gvpD*, das in großen Mengen vorhanden ist. Während der stationären Wachstumsphase ist auch der mcA-Promotor aktiv und führt zur Bildung sehr großer Mengen der 0,32 kb großen mc-*gvpA*-mRNA sowie zur Bildung weiterer Transkripte der Größen 1,8 und 2,4 kb, die mc-*gvpAC* überspannen sowie dem 3,0 kb großen Transkript mit mc-*gvpACNO* (Abb. 1).

Für die Untersuchung der mRNA-Stabilitäten der verschiedenen Transkripte der mc-vac-Region wurden deren Halbwertszeiten bestimmt (Jäger *et al.*, 2002). Die Analyse der Halbwertszeiten zeigte, dass die Stabilität der verschiedenen mRNA's umgekehrt proportional

zu ihrer Länge war (Tabelle 1). Die 0,32 kb große *mc-gvpA*-mRNA zeigte sich als besonders langlebig mit einer Halbwertszeit von 80 min. Dies könnte möglicherweise auf eine Sekundärstruktur am 3'-Ende der *gvpA*-mRNA zurückzuführen sein. Für das 3'-Ende der *p-gvpA*-mRNA konnte eine putative *stem-loop*-Struktur vorhergesagt werden. Die Analyse einer *p-gvpA*-Mutante, bei der die entsprechende DNA für die putative *stem-loop*-Struktur deletiert war, zeigte eine drastische Reduktion an nachzuweisender *p-gvpA*-mRNA und bestätigte die Vermutung, dass eine mögliche *stem-loop*-Struktur am 3'-Ende der *gvpA*-mRNA deren Stabilität erhöht (Hofacker, 2002).



**Abb. 1.** Gasvesikel-kodierende Regionen von *Hb. salinarum* (p-vac und c-vac) und *Hf. mediterranei* (mc-vac) und schematische Darstellung der Transkripte, die ausgehend von der mc-vac-Region von den Promotoren mcD und mcA aus gebildet werden (nach Röder & Pfeifer, 1996). Die *gvp*-Gene sind als Kästen dargestellt und mit Großbuchstaben bezeichnet. Die Pfeile unterhalb der mc-vac-Region stellen schematisch die gebildeten Transkripte dar, wobei die Reihenfolge der Transkripte der Nachweisbarkeit während dem Wachstum von *Hf. mediterranei* und die Stärke der Pfeile der Transkriptmenge entspricht. Die Zahlen an den Spitzen der Pfeile geben die Länge der Transkripte (in kb) an. Die beiden regulatorischen Proteine GvpE und GvpD sind schematisch dargestellt. Ihre Wirkung als Aktivator und an der Repression beteiligtem Protein ist durch die Art der Pfeile (↓ = Aktivator; ⊥ = repressorisch) sowie durch „+“ und „-“ dargestellt.

**Tabelle 1.** Halbwertszeiten von mc-vac-Transkripten bei 25% Salz

mRNA	$t_{1/2}$	mRNA	$t_{1/2}$
0,45 kb mc- <i>gvpD</i>	10 min	0,32 kb mc- <i>gvpA</i>	80 min
1,3 kb mc- <i>gvpD</i>	7 min	1,8 kb mc- <i>gvpACN'</i>	20 min
2,2 kb mc- <i>gvpDE</i>	6 min	2,4 kb mc- <i>gvpACN'</i>	16 min
		3,0 kb mc- <i>gvpACNO</i>	12 min

Für einige Genprodukte der 14 Gene enthaltenden vac-Regionen konnte bereits eine konkrete Funktion gezeigt werden: Die beiden Proteine GvpA und GvpC sind die Strukturproteine der Gasvesikel. GvpJ und GvpM zeigen jeweils eine gewisse Ähnlichkeit in ihrer Aminosäuresequenz mit GvpA und könnten daher ebenfalls an der Struktur der Gasvesikel beteiligt sein oder eine Funktion beim Zusammenbau der Gasvesikel haben (Englert *et al.*, 1992a; Walsby, 1994). GvpE ist ein Transkriptionsaktivator, der die Transkription am mcA- und mcD-Promotor stark erhöht (Krüger & Pfeifer, 1996; Röder & Pfeifer, 1996; Krüger *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu ist GvpD an der Repression der *gvpA*-mRNA-Bildung beteiligt (Englert *et al.*, 1992b; Röder & Pfeifer, 1996). Die Funktion aller anderen Gvp-Proteine ist noch unklar. Mit Hilfe von Transformationsexperimenten mit dem Gasvesikel-negativen Empfängerstamm *Hf. volcanii* konnte jedoch gezeigt werden, dass für die Gasvesikelbildung nur die acht Gene *gvpA*, *gvpO*, *gvpF*, *gvpG*, *gvpJ*, *gvpK*, *gvpL* und *gvpM* essentiell sind (Offner *et al.*, 2000).

## Transkription und Transkriptionsregulation in Archaea

Die Transkription in Archaea stellt ein Mosaik aus eukaryotischen und bakteriellen Prinzipien dar. Während der basale Transkriptionsapparat eine vereinfachte Version des eukaryotischen Transkriptionsapparats von RNA-Polymerase II (RNAP II) darstellt, sind fast alle bisher charakterisierten archaealen Transkriptionsregulatoren ähnlich zu bakteriellen Regulatoren.

Die ersten Hinweise auf eine Ähnlichkeit der archaealen mit der eukaryotischen Transkription kamen durch die Analyse der RNA-Polymerase aus *Sulfolobus acidocaldarius* (Zillig *et al.*, 1979), die in ihrer Untereinheitenzusammensetzung eher den eukaryotischen RNAP II ähnelte als den bakteriellen RNA-Polymerasen.

Biochemische Untersuchungen der aus Zellextrakten isolierten RNA-Polymerasen, sowie die Analyse der bisher vollständig bestimmten Genomsequenzen von Archaea zeigen, dass die archaealen RNA-Polymerasen aus 10 bis 14 Untereinheiten aufgebaut sind (Zillig *et al.*, 1979; Langer *et al.*, 1995; Bult *et al.*, 1996; Klenk *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997; Ng *et al.*, 2000; Kawarabayasi *et al.*, 1998 und 2001; She *et al.*, 2001). Die Untereinheiten der

archaealen RNAP's sind dabei homolog zu den entsprechenden Untereinheiten der eukaryotischen RNAP's. Durch einzelne rekombinante Expression der 12 putativen RNA-Polymerase-Untereinheiten kodierenden Gene aus *Methanococcus jannaschii* konnte eine funktionelle RNA-Polymerase reassembliert werden (Werner und Weinzierl, 2002). Dies zeigte, dass die RNAP aus *M. jannaschii* tatsächlich aus den 12 postulierten Untereinheiten aufgebaut ist.

Im Gegensatz zur eukaryotischen Transkription existiert in Archaea nur jeweils eine einzige RNAP, die für die Transkription von Protein-kodierenden Genen sowie für die Transkription der rRNA- und der tRNA-Gene verantwortlich ist.

Im Unterschied zu den archaealen und eukaryotischen RNAP's sind die bakteriellen RNAP's wesentlich einfacher aufgebaut und bestehen nur aus drei verschiedenen Untereinheiten in der Zusammensetzung  $\alpha_2\beta\beta'$ . An das bakterielle Kernenzym bindet einer von vielen in Bakterien produzierten  $\sigma$ -Faktoren, der die RNAP an den Promotor führt und dabei die Spezifität bestimmt.

Die archaeale RNAP ist wie die eukaryotische RNAP und das bakterielle RNAP-Kernenzym nicht in der Lage, alleine Promotoren zu erkennen und die Transkription zu initiieren. Für die Transkriptionsinitiation in Archaea sind zwei weitere Faktoren notwendig, das TATA-Box-Bindeprotein (TBP) und der Transkriptionsfaktor B (TFB) (Hausner & Thomm, 1993). Sowohl das archaeale TBP als auch TFB sind homolog zu den eukaryotischen Faktoren TBP und TFIIB. In *vitro*-Analysen mit RNAP, TBP und TFB zeigten, dass diese drei Komponenten ausreichen, um eine Transkription bei den meisten archaealen Promotoren zu initiieren (Hethke *et al.*, 1996; Qureshi *et al.*, 1997; Bell *et al.*, 1998).

Ein typischer archaealer Promotor enthält zwei wichtige Elemente: Eine TATA-Box bei ca. -27 relativ zum Transkriptionsstart und das BRE-Element (*transcription factor B recognition element*), das sich stromauf der TATA-Box bei ca. -34 befindet (Abb. 2) (Reiter *et al.*, 1990; Hain *et al.*, 1992; Soppa, 1999b).

Die TATA-Box der Archaea ist ähnlich der TATA-Box der Eukaryonten eine AT-reiche Sequenz und hat bei Halobakterien die Konsensussequenz TTT[T/A][T/A][T/A] (Soppa, 1999b). Die TATA-Box wird von TBP gebunden und ist verantwortlich für die Dirigierung der RNAP zum Transkriptionsstart. Das BRE-Element besteht hauptsächlich aus zwei konservierten Adeninen strangauf der TATA-Box und hat bei *Sulfolobus* die Konsensussequenz [A/G]N[A/T]AA[A/T]N (N = beliebige Base). Bei thermophilen Archaea konnte gezeigt werden, dass das BRE-Element von TFB gebunden wird und vor allem eine Rolle bei der richtigen Orientierung des Präinitiationskomplexes spielt (Bell *et al.*, 1999a).

### Archaeale Transkriptionsinitiation

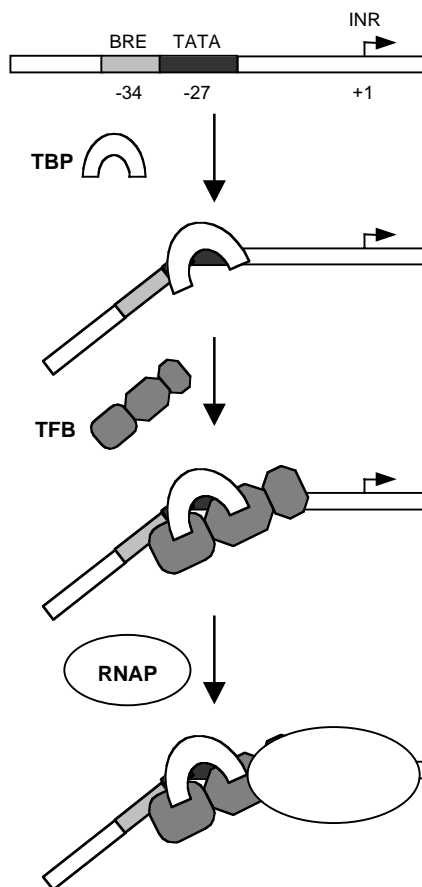
Die archaeale Transkriptionsinitiation ist bisher vor allem bei thermophilen und methanogenen Archaea *in vitro* untersucht worden. Da für Halobakterien bisher kein ähnliches *in vitro*-System zur Verfügung steht, begründen sich die Kenntnisse über die archaeale Transkriptionsinitiation auf die beiden erstgenannten Gruppen. Bei thermophilen Archaea beginnt die Transkriptionsinitiation mit der Bindung des TBP's an die TATA-Box (Abb. 2). TBP ist aus zwei imperfekten direkten Sequenzwiederholungen aus ca. 90 Aminosäuren aufgebaut, die dem Protein eine sehr symmetrische sattelförmige Struktur verleihen. Die Bindung von TBP bewirkt eine Konformationsänderung der DNA im Bereich der TATA-Box, so dass es zu einem starken Knick von ca. 80° kommt (Kosa *et al.*, 1997; Littlefield *et al.*, 1999). TFB bindet im nächsten Schritt an den Komplex aus Promotor-DNA und TBP und interagiert dabei sowohl mit TBP als auch mit DNA-Sequenzen der TATA-Box und des BRE-Elements (Abb. 2) (Qureshi & Jackson, 1998; Kosa *et al.*, 1997; Littlefield *et al.*, 1999). TFB enthält ebenfalls zwei imperfekte Sequenzwiederholungen aus ca. 90 Aminosäuren, die 2/3 des C-terminalen Bereichs des Proteins ausmachen und ein *zinc-ribbon*-Motiv im N-terminalen Bereich. Die Analyse der Kristallstruktur eines Komplexes mit TBP und TFB aus *Pyrococcus woesei* und einem DNA-Molekül mit der Sequenz der TATA-Box und des BRE-Elements zeigte, dass ein *helix-turn-helix*-Motiv aus der zweiten, C-terminalen Wiederholungsdomäne sequenzspezifisch mit dem BRE-Element interagierte. Diese Interaktion ist vor allem wichtig für die richtige Orientierung des Präinitiationskomplexes zum Startpunkt hin, da das symmetrische TBP eine Orientierung in beide Richtungen ermöglicht (Kosa *et al.*, 1997; Littlefield *et al.*, 1999; Bell *et al.*, 1999a).

An den Komplex aus Promotor-DNA, TBP und TFB bindet schließlich die RNAP und wird an die Transkriptionsstartstelle rekrutiert (Abb. 2) (Bell *et al.*, 1999a). Für diesen Vorgang wird vor allem die *zinc-ribbon*-Domäne im N-terminalen Bereich von TFB benötigt (Bell & Jackson, 2000a).

*Footprint*-Analysen zeigten, dass die RNAP dabei einen Bereich von -43 bis +8 relativ zum Transkriptionsstart bedeckt (Bell & Jackson, 2000a). Nach dem Binden der RNAP katalysiert diese das Auftrennen des DNA-Doppelstrangs in einem Bereich von 13 bp von -10 bis +3 und initiiert die RNA-Synthese (Bell *et al.*, 1998; Bell & Jackson, 2000a).

Während Eukaryonten und die meisten Archaea jeweils nur ein einzelnes *tbp*- und *tfb*-Gen besitzen, konnten in Halobakterien und in *Pyrococcus horikoshii* multiple *tbp*- und *tfb*-Gene nachgewiesen werden. In *Halobacterium* sp. NRC-1 existieren sechs *tbp*-Gene und sieben *tfb*-Gene (Reeve *et al.*, 1997; Ng *et al.*, 2000). In *Hf. volcanii* wurden ebenfalls mehre-

re *thp*-Gene und sechs *tfb*-Gene gefunden (Thompson *et al.*, 1999; Palmer & Daniels, unveröffentlicht). Das Auftreten multipler *thp*- und *tfb*-Gene könnte eine Rolle bei der Genregulation spielen (Baliga & DasSarma, 2000), da bei *Halobacterium* z. B. 42 verschiedene Kombinationen der beiden Proteine möglich wären und durch alternative TBP-TFB-RNAP-Komplexe eventuell verschiedene Promotoren angesprochen oder unterschiedlich effizient gebunden werden könnten. In *Hf. volcanii* wurde bereits gezeigt, dass die Transkription eines bestimmten *tfb*-Gens spezifisch als Antwort auf Hitzeschock aktiviert wird (Thompson *et al.*, 1999).



**Abb. 2.** Schematische Darstellung der Schritte der Transkriptionsinitiation in Archaea (nach Bell *et al.*, 2001, verändert). Im ersten Schritt bindet TBP an die archaeale TATA-Box. TFB bindet dann an den Komplex aus TBP und TATA-Box und interagiert dabei spezifisch mit der Sequenz des BRE-Elements. An diesen Komplex bindet schließlich die archaeale RNA-Polymerase (RNAP) und es bildet sich der Präinitiationskomplex aus.

### Weitere Transkriptionsfaktoren

Aus Eukaryonten kennt man zahlreiche weitere Transkriptionsfaktoren, die bei der Initiation der Transkription durch RNAP II beteiligt sind. Die Analyse der bisher vollständig bestimmten Genomsequenzen verschiedener Archaea erbrachte jedoch bisher keine Hinweise auf die Anwesenheit von Homologen zu den eukaryotischen Transkriptionsfaktoren TFIIA, TFIIF oder TFIIF oder zu den zahlreichen TAF's (TBP associated factors).

Es konnte jedoch in allen Genomsequenzen ein Homolog zu dem Transkriptionsfaktor TFIIE gefunden werden, der in Archaea als TFE bezeichnet wurde (Bell *et al.*, 2001b; Han-

zelka *et al.*, 2001). Obwohl für die meisten Promotoren ein Komplex aus TBP, TFB und RNAP ausreicht, um eine effiziente Transkription zu ermöglichen, bewirkt TFE bei einigen Promotoren eine bis zu dreifache Aktivierung der Transkription. TFE interagiert sowohl mit der RNAP als auch mit TBP und scheint dabei die Interaktion von TBP und TATA-Box zu stabilisieren, wenn diese nicht optimal erfolgt (Bell *et al.*, 2001b; Hanzelka *et al.*, 2001).

In archaealen Genomsequenzen konnte ein weiterer Transkriptionsfaktor entdeckt werden, der Ähnlichkeiten zu dem eukaryotischen Transkriptionsfaktor TFIIS aber auch zu einer RNAP-Untereinheit der RPB9-Familie aufweist (Langer & Zillig, 1993; Bell & Jackson, 1998). In einem zellfreien *in vitro*-System mit dem Homolog aus *Methanococcus thermolithotrophicus* konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um ein TFIIS-Homolog handelt, das wie das entsprechende eukaryotische Protein bei der Transkriptionselongation beteiligt ist und in der RNAP eine Nukleaseaktivität induziert, die vom 3'-Ende der RNA Nukleotide abspaltet (Hausner *et al.*, 2000). Das Protein wurde entsprechend als TFS bezeichnet.

Die Genomsequenzen der beiden Archaea *Archaeoglobus fulgidus* und *Pyrococcus horikoshii* enthalten ein Gen, das Ähnlichkeiten zu einem in Eukaryonten gefundenen Gen hat, das für ein Protein namens TIP49 kodiert (*TBP interacting protein of 49 kDa*), das mit TBP interagiert (Kanemaki *et al.*, 1997). Die Funktion dieses Proteins ist bisher noch unklar, aber alle Sequenzen ähnlicher Proteine enthalten ein *p-loop*-Motiv, das eine putative ATP-/GTP-Bindestelle darstellt (Soppa, 1999a).

### Regulation der Transkription in Archaea

Das Prinzip der bakteriellen Genregulation beruht neben der  $\sigma$ -Faktor-abhängigen Promotorerkennung in der Regel auf der Assoziation und Dissoziation von Regulatoren im Bereich des Promotors, die das Andocken der bakteriellen RNAP begünstigen (Aktivatoren) oder verhindern (Repressoren). Dabei werden meist ganze Transkriptionseinheiten mit mehreren hintereinander liegenden Leserahmen (Operons) von der Regulation eines einzigen Promotors gesteuert.

Bei Eukaryonten hingegen sind Gene nicht in Operons organisiert, sondern werden jeweils einzeln reguliert. Dabei werden einzelne Gene oft von mehreren Regulatoren moduliert. Die Prinzipien der eukaryotischen Regulation gehen über das Binden von Regulatoren an die Promotorsequenzen hinaus. Eukaryotische Regulatoren wirken auch oft dadurch, dass sie die Chromatinstruktur der DNA beeinflussen, indem sie mit Histonen interagieren bzw. diese durch Acetylierung/Deacetylierung modifizieren und dadurch die entsprechenden Promotorstellen für die Transkription zugänglich machen (Aktivatoren) oder deren Zugänglich-



keit verhindern (Repressoren). Viele eukaryotische Regulatoren interagieren auch mit den TAF's und modulieren dadurch die Rekrutierung der RNAP.

Archaeale Gene sind wie die bakteriellen Gene in Operons organisiert und werden als Transkriptionseinheiten reguliert. Da der basale Transkriptionsapparat der Archaea jedoch eine vereinfachte Version des eukaryotischen darstellt und wenig mit der Transkription in Bakterien gemein hat, wurde erwartet, dass auch die Regulation der Transkription in Archaea Ähnlichkeiten zur eukaryotischen Transkriptionsregulation aufweist. Um so überraschender war die Tatsache, dass die bisher charakterisierten oder in archaealen Genomen annotierten Regulatoren Ähnlichkeiten zu bakteriellen Regulatoren zeigten (Aravind & Koonin, 1999; Bell *et al.*, 1999a; Hochheimer *et al.*, 1999; Brinkman *et al.*, 2000 und 2002; Enoru-Eta *et al.*, 2000; Leonard *et al.*, 2001). Viele dieser Regulatoren weisen ein *helix-turn-helix*-Motiv auf, das ein typisches DNA-Bindemotiv bakterieller Regulatoren darstellt (Pabo & Sauer, 1992).

Die Wirkungsweise einiger archaealer Regulatoren ist bereits beschrieben worden (Bell *et al.*, 1999a; Hochheimer *et al.*, 1999; Brinkman *et al.*, 2000 und 2002; Enoru-Eta *et al.*, 2000; Leonard *et al.*, 2001). Im folgenden seien exemplarisch zwei gut charakterisierte Beispiele genannt:

Der in *Archaeoglobus fulgidus* gefundene Metall-abhängige Repressor MDR1 (*metal-dependent repressor 1*) ist homolog zu bakteriellen Metall-abhängigen Repressoren und reprimiert die Transkription einer polycistronischen Einheit von Genen, die für den Repressor selbst und für einen ABC-Transporter kodieren, der für die Aufnahme von zweiwertigen Metallionen wie  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  und  $\text{Ni}^{2+}$  verantwortlich ist. Bei Anwesenheit der Metallionen binden drei MDR1-Moleküle in einer metallabhängigen Weise kooperativ an drei Stellen strangab der TATA-Box des eigenen Promotors und verhindern dadurch das Andocken der RNAP. Das Binden der Transkriptionsfaktoren TBP und TFB bleibt dabei jedoch unbeeinflusst. Somit kann unter Metallionen-limitierenden Bedingungen der Repressor dissoziieren und die RNAP an den Komplex aus Promotor-DNA, TBP und TFB assoziieren und für eine schnelle Transkription der entsprechenden Gene sorgen (Bell *et al.*, 1999b; Bell & Jackson, 2001).

In den Archaea *Pyrococcus furiosus*, *Sulfolobus acidocaldarius* und *Sulfolobus solfataricus* wurden Homologe des bakteriellen Regulators Lrp (*leucine responsive regulatory protein*) beschrieben (Charlier *et al.*, 1997; Bell & Jackson 2000b; Brinkman *et al.*, 2000 und 2002; Enoru-Eta *et al.*, 2000; Leonard *et al.*, 2001). Lrp wirkt in Bakterien als globaler Regulator, der die Expression von ca. 75 Genen des Aminosäurestoffwechsels reguliert (Calvo &

Matthews, 1994). Lrp kann dabei sowohl als Aktivator als auch als Repressor fungieren. Leucin kann bei der Aktivität beteiligt sein und diese erhöhen oder erniedrigen.

Das archaeale Homolog Lrs14 aus *Sulfolobus solfataricus* besitzt wie das bakterielle Lrp ein *helix-turn-helix*-Motiv und bindet an mindestens zwei Stellen an seinem eigenen Promotor, die die TATA-Box und das BRE-Element beinhalten. Dadurch wird die Assoziation von TBP und TFB an den Promotor blockiert und die Ausbildung des Präinitiationskomplexes verhindert (Napoli *et al.*, 1999; Bell & Jackson 2000b).

Eukaryotische Regulationsprinzipien konnten in Archaea nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es gibt jedoch Hinweise, dass in Archaea auch der Grad der Chromatinisierung eine Rolle bei der Transkriptionsregulation spielen könnte, da sie wie die Eukaryonten Histone besitzen, die eine Superspiralisierung der DNA bewirken (Reeve *et al.*, 1997). Kürzlich konnte bei *Sulfolobus* gezeigt werden, dass die Modifizierung des archaealen Histonproteins Alba (*acetylation lowers binding affinity*) durch Deacetylierung dessen DNA-Affinität erhöhte und die deacetylierten Alba-Moleküle *in vitro* die Transkription inhibierten (Bell *et al.*, 2002).

Der einzige archaeale Transkriptionsregulator, der keine offensichtlichen Motive bakterieller Regulatoren enthält, aber im C-terminalen Bereich strukturelle Ähnlichkeiten zu eukaryotischen basischen Leucinzipperproteinen aufweist, ist der Transkriptionsaktivator GvpE, der in den Halobakterien *Hb. salinarum* und *Hf. mediterranei* die Transkription der Gasvesikelgene aktiviert (Krüger & Pfeifer, 1996; Röder & Pfeifer, 1996; Krüger *et al.*, 1998; Plöber & Pfeifer, 2002).

## Regulation der Gasvesikelbildung

Die Regulation der Gasvesikelbildung in den Halobakterien eignet sich als Modellsystem für das Studium der archaealen Genregulation, da die Gasvesikelbildung auf der Ebene der Transkription streng reguliert wird und dabei sowohl die Aktivierung als auch die Reprimierung von Gasvesikelgenen eine Rolle spielt. Die Regulation der Gasvesikelbildung kann dabei durch mehrere Faktoren wie Wachstumsphase, Salzkonzentration und Lichtintensität beeinflusst werden.

Für die Analyse der Regulation der Gasvesikelbildung steht zwar bisher kein *in vitro*-System zur Verfügung, das analog der Charakterisierung von Regulatoren aus thermophilen Archaea die Untersuchung möglicher Interaktionen von regulatorischen Gvp-Proteinen mit dem basalen Transkriptionsapparat erlaubt, aber in Halobakterien sind im Gegensatz zu thermophilen Archaea Untersuchungen *in vivo* mit halobakteriellen Transformanten möglich. Für

diese Analysen stehen mehrere Plasmidvektoren zur Verfügung, die jeweils einen Replikationsursprung für die Vermehrung in *E. coli* und einen Replikationsursprung für die Vermehrung in *Hf. volcanii* besitzen. Plasmide mit verschiedenen halobakteriellen Replikationsursprüngen und Resistenzgenen ermöglichen die gleichzeitige Transformation von *Hf. volcanii* mit zwei Plasmidkonstrukten. Der Expressionsvektor pJAS35 enthält den Ferredoxin-Promotor aus *Hb. salinarum* und ermöglicht dadurch die Expression von Genen, die keinen eigenen Promotor besitzen. Der Rezipient *Hf. volcanii* besitzt selbst keine *gvp*-Gene und eignet sich daher für die Transformation mit *gvp*-Genen enthaltenden Plasmidkonstrukten (Cline *et al.*, 1987; Lam & Doolittle, 1989; Holmes *et al.*, 1991; Pfeifer *et al.*, 1994). Für die Analyse halobakterieller Promotoren und ihre Modulierung durch Transkriptionsregulatoren steht ausserdem mit dem *bgaH*-Gen aus *Hf. lucentensis* ein Reportergensystem zur Verfügung, das für ein Protein mit einer  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität kodiert (Holmes & Dyall-Smith, 2000; Patenge *et al.*, 2000; Gregor & Pfeifer, 2001).

An der Regulation der Gasvesikelbildung sind mindestens zwei Proteine beteiligt: Der Transkriptionsaktivator GvpE aktiviert sowohl den *gvpA*- als auch den *gvpD*-Promotor (Krüger & Pfeifer, 1996; Röder & Pfeifer, 1996). Dabei ist bei der *c-vac*- und der *mc-vac*-Region GvpE essentiell für die effiziente Transkription der *gvpA*-Promotoren, ansonsten sind jedoch für die Aktivierung keine weiteren Gvp-Proteine nötig (Krüger & Pfeifer, 1996; Röder & Pfeifer, 1996; Gregor & Pfeifer, 2001). Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der drei GvpE-Proteine cGvpE, pGvpE und mcGvpE weisen zwei interessante Motive im C-terminalen Bereich der Proteine auf: Ein DNA-Bindemotiv (DNAB) mit hauptsächlich basischen Aminosäuren der Sequenz KRKVYR (Position 144 bis 148; basische Aminosäuren sind unterstrichen) und ein Leucinzippermotiv mit der Sequenz [V/I/L]X<sub>6</sub>LX<sub>6</sub>LX<sub>6</sub>C (Position 159 bis 180; X = beliebige Aminosäure) (Horne *et al.*, 1991; Krüger *et al.*, 1998). Das *molecular modeling* des C-terminalen Bereiches schlug eine Leucinzipperstruktur für GvpE vor, bei der das Leucinzippermotiv eine Dimerisierung des Proteins bewirkt und die basische DNAB-Region mit DNA interagiert (Krüger *et al.*, 1998). Als Vorlage für das *molecular modeling* diente das eukaryotische basische Leucinzipperprotein GCN4 aus *Saccharomyces cerevisiae* (Ellenberger *et al.*, 1992). Biochemische Analysen von rekombinant hergestellten cGvpE-Proteinen mit einem C-terminalen His-tag zeigten, dass das Protein in Lösung Dimere bildete (Plößer & Pfeifer, 2002). Die Analyse von Mutanten, die Aminosäureaustausche in der DNAB-Region von cGvpE verursachten, führten zu Proteinen, die nicht mehr in der Lage waren, den *gvpA*-Promotor zu aktivieren (Krüger *et al.*, 1998). Ebenso verursachten Mutationen, die Aminosäureaustausche in der Leucinzipper-Region von cGvpE erzeugten, in den

meisten Fällen zu Proteinen, die weder in der Lage waren, den *gvpA*-Promotor zu aktivieren, noch in Lösung zu dimerisieren (Plöber & Pfeifer, 2002).

Obwohl bisher keine direkte Protein-DNA-Wechselwirkung für das GvpE-Protein gezeigt werden konnte, gibt es jedoch Hinweise auf die mögliche GvpE-Bindestelle im *gvpA*-Promotor aus Reportergenanalysen mit dem *bgaH*-Reportergen, das für ein Protein mit einer  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität kodiert (Gregor, 2002). Hierbei wurden *gvpA*-Promotor-*bgaH*-Fusionskonstrukte hergestellt, bei denen die Sequenz des *gvpA*-Promotors durchgängig mutiert bzw. abschnittsweise deletiert wurde. Die Analyse der Promotormutanten zeigte, dass vor allem Mutationen innerhalb einer Sequenz von -28 bis -57 relativ zum Transkriptionsstart zu einem Verlust der Aktivierbarkeit durch GvpE führten (Gregor, 2002), ein Bereich, der sowohl das BRE-Element als auch den Sequenzbereich stromauf des BRE-Elements beinhaltet.

Im Gegensatz zu GvpE ist das Genprodukt von *gvpD* an der Repression der Gasvesikelbildung beteiligt. Transformationsexperimente mit *Hf. volcanii*-Transformanten, die die gesamte mc-vac-Region enthielten, bei der im offenen Leserahmen von *gvpD* jedoch eine 918 bp-Deletion durch eine Restriktion mit *XhoI* verursacht wurde ( $\Delta D$ -Konstrukt), zeigten eine starke Überproduktion von Gasvesikeln (Englert *et al.*, 1992b). Diese Überproduktion ließ sich wieder rückgängig machen, indem mc-*gvpD* auf einem zweiten Plasmidkonstrukt exprimiert wurde. Diese Ergebnisse zeigten, dass GvpD an der Repression der Gasvesikelbildung beteiligt ist.

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der drei GvpD-Proteine cGvpD, pGvpD und mcGvpD zeigen drei interessante Bereiche: Nahe dem N-Terminus von GvpD befindet sich ein sogenanntes *p-loop*-Motiv mit der Sequenz LXNGAPGXGKT (Position 36 bis 46; X = beliebige Aminosäure; die *p-loop*-Konsensussequenz ist unterstrichen), das ein mögliches ATP-/GTP-Bindemotiv darstellt. Des weiteren befinden sich in den Aminosäuresequenzen noch zwei basische Regionen mit den Sequenzen RGRTRRXLRLXKLRG und LRRRADR (Positionen 201 bis 222 und 494 bis 499; X = beliebige Aminosäure; basische Aminosäuren sind unterstrichen), die putative DNA-Binderegionen darstellen können (Horne *et al.*, 1991; Pfeifer *et al.*, 2001). Im Rahmen der Diplomarbeiten von Jens Zotzel (1998) und Brigitta Kurenbach (1999) wurden die konservierten Aminosäuren des *p-loop*-Motivs, sowie die basischen Aminosäuren in den beiden basischen Regionen von mcGvpD ausgetauscht. Die Herstellung der Mutanten von mc-*gvpD* erfolgte in beiden Arbeiten durch ortsgerichtete PCR-Mutagenese, bei der die Codons für die entsprechenden Aminosäurereste verändert wurden. Die gentechnisch veränderten mc-*gvpD*-Leserahmen wurden in  $\Delta D/D_{mut}$ -Transformanten von *Hf. volcanii* auf ihre Fähigkeit untersucht, die Gasvesikelbildung zu reprimieren. Dabei zeigte

eine Überexpression von Gasvesikeln an, dass das entsprechend mutagenisierte GvpD<sup>mut</sup> nicht mehr aktiv und damit die ausgetauschte Aminosäure essentiell für dessen Funktion war (Abb. 3) (Pfeifer *et al.*, 2001). Der Austausch von konservierten Aminosäuren im *p-loop*-Motiv von mcGvpD verursachte in allen  $\Delta D/D^{\text{mut}}$ -Transformanten einen Funktionsverlust des mcGvpD-Proteins (Abb. 3, mittlere Reihe) (Zotzel, 1998; Pfeifer *et al.*, 2001). Der Austausch von basischen Aminosäuren in der basischen Region 1 von GvpD führte ebenfalls in allen  $\Delta D/D^{\text{mut}}$ -Transformanten zu einem Funktionsverlust des GvpD-Proteins, wohingegen der Austausch in der basischen Region 2 nur zum Teil zu einem Funktionsverlust der repressori-schen Wirkung von GvpD führte (Abb. 3, untere Reihe) (Kurenbach, 1999; Pfeifer *et al.*, 2001).



**Abb. 3.** Vac-Phänotypen von *Hf. volcanii* und Transformanten von *Hf. volcanii* auf Agarplatten. Die obere Reihe zeigt den Wildtyp von *Hf. volcanii* und Kontrolltransformanten. Kolonien, die Gasvesikel überproduzieren (Vac<sup>++</sup>) erscheinen weißlich-rosa und opaque ( $\Delta D$ ). Kolonien mit „normaler“ Gasvesikelbildung (Vac<sup>+</sup>) erscheinen rosa und durchsichtig (mc-vac), wohingegen Kolonien, die keine Gasvesikel produzieren (Vac<sup>-</sup>) rot und durchsichtig erscheinen (*Hf. volcanii* und  $\Delta D/D$ ). In der mittleren Reihe sind Kolonien von Transformanten abgebildet, die  $\Delta D/D^{\text{mut}}$ -Konstrukte mit Mutationen in der *p-loop*-Region enthalten. G39A, G42A, G44A, K45E und P41A geben die einzeln ausgetauschten Aminosäuren im Einbuchstaben-Code und deren Position an. Bei EDD wurden die drei konservierten Glycine durch Glutamat und zwei Aspartate ausgetauscht. In der unteren Reihe sind Kolonien von Transformanten abgebildet, die  $\Delta D/D^{\text{mut}}$ -Konstrukte mit Mutationen in den beiden basischen Regionen enthalten. AAAA und AEAE geben die Aminosäureaustausche der ersten 4 Arginine in der basischen Region 1 im Einbuchstaben-Code an. 2-AAA gibt die ausgetauschten Aminosäuren an den Positionen 209 (R), 212 (K) und 214 (R) in der basischen Region 1 an. Bei 2-AAAR wurde zusätzlich Position 215 (G) durch Arginin ersetzt. 3-AAA und 3-ADA geben die Aminosäureaustausche der drei hintereinander liegenden Arginine in der basischen Region 2 an. Der Hintergrund mit der Farbe der Agarplatte wurde zur besseren Visualisierung digital entfernt und durch einen schwarzen Hintergrund ersetzt (Photo: P. Zimmermann, 2001).

*Hf. volcanii*-Transformanten, die die gesamte mc-vac auf einem Plasmid enthalten, zeigen eine ähnliche wachstumsphasenabhängige Regulation der Gasvesikelbildung bzw. der mc-gvpA-mRNA-Bildung wie *Hf. mediterranei* (Englert *et al.*, 1992b). *Hf. volcanii*-Transformanten, die ein Subfragment der mc-vac-Region mit gvpADE enthalten, zeigen diese

Regulation jedoch nicht und produzieren schon in der exponentiellen Wachstumsphase große Mengen mc-*gvpA*-mRNA (Röder & Pfeifer, 1996). Diese Beobachtung zeigte, dass die Anwesenheit von mc-*gvpD* zusätzlich zu mc-*gvpE* und mc-*gvpA* für die Reprimierung der mc-*gvpA*-mRNA-Bildung in der exponentiellen Wachstumsphase nicht ausreichte. In weiteren Analysen mit *Hf. volcanii*-Transformanten, die Subfragmente der mc-vac-Region enthielten, konnte die für die Repression des mcA-Promotors nötige Region auf einen Bereich eingegrenzt werden, der die Gene mc-*gvpDEFG* und mc-*gvpACN* enthielt (Röder, 1997). Dabei blieb allerdings noch unklar, welche Gene aus diesem Bereich tatsächlich an der Regulation der mc-*gvpA*-mRNA-Bildung beteiligt sind.

## Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte die Regulation der Gasvesikelbildung in dem moderat halophilen Archaeon *Hf. mediterranei* untersucht werden. Ein wichtiges Ziel war dabei vor allem, der Frage nachzugehen, welche Proteine zusätzlich zu mcGvpD und mcGvpE bei der Regulation der Transkription von Gasvesikelgenen beteiligt sind. Hierzu sollten Transformanten von *Hf. volcanii* auf mRNA- und Proteinebene untersucht werden, die verschiedene Subfragmente der mc-vac-Region enthielten. Mit Hilfe des Reportergens *bgaH* aus *Hf. lucentensis* sollte der Einfluß bestimmter mc-*gvp*-Proteine auf die Aktivität des mcA-Promotors auch in einer quantitativeren Weise analysiert werden.

Ein weiteres Ziel war die Generierung von Antiseren gegen die Proteine mcGvpD, mcGvpE und mcGvpF, um deren zeitliches Auftreten während dem Wachstum von *Hf. mediterranei* mittels Western-Analysen verfolgen zu können. Dafür sollten diese Proteine rekombinant in *E. coli* mit einem N-terminalen His-tag produziert und mittels Metallionenaffinitätschromatographie isoliert werden. Darüber hinaus sollten die Antiseren auch als analytisches Hilfsmittel zum Nachweis der entsprechenden Proteine im Rahmen weiterer Untersuchungen dienen. Hierbei stand z. B. der Nachweis der Bildung der veränderten GvpD<sup>mut</sup>-Proteine in den ΔD/D<sup>mut</sup>-Transformanten an ganz wichtiger Stelle, um zeigen zu können, dass die Vac<sup>++</sup>-Phänotypen auf die Bildung von nicht-funktionsfähigen GvpD-Proteinen und nicht auf das Fehlen von GvpD zurückzuführen waren.

Für biochemische Untersuchungen sollten die drei genannten Proteine und zusätzlich auch die Proteine mcGvpC, mcGvpN und mcGvpG als His-tag-Fusionsproteine gereinigt und zum Nachweis möglicher Protein-Protein-Interaktionen verwendet werden. Mit Hilfe von gereinigtem GvpD sollte auch eine mögliche ATP-/GTP-Bindefunktion des *p-loop*-Motivs von GvpD gezeigt werden.

# Material und Methoden

## Besondere Materialien und Chemikalien

Biodyne A Nylon-Transfermembranen	Pall Corporation
Biomax MR Röntgenfilme	Kodak, Rochester
BioTrace Nitrocellulose-Transfermembranen	Pall Gelman Sciences
Concert Rapid Plasmid Miniprep	Invitrogen
CSPD	Roche Diagnostics, Mannheim
DAp Goldstar DNA Polymerase	Eurogentec, Seraing
DIG DNA/DIG RNA Labelling Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
DIG Luminescent Detection Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
ECL-Detektionskit	Amersham Pharmacia, UK
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid (IPTG)	Eurogentec, Seraing, Belgien
Lovastatin (Mevinolin-Derivat)	Geschenk von MSD Merck
Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni-NTA-Agarose)	Sharp & Dohme GmbH
Novobiocin	Qiagen GmbH, Hilden
ONPG (ortho-Nitrophenylgalaktosid)	Sigma, St. Louis
Polyethylenglykol PEG 600	Merck, Darmstadt
QIAGEN Tip-20	Sigma, St. Louis, USA
QIAprepSpin	Qiagen GmbH, Hilden
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
NucleoSpin	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy Total RNA Kit	Macherey-Nagel
SequiTherm EXCEL Long-Read Sequencing Kit-LC	Qiagen GmbH, Hilden
T3/T7 RNA Transcription Kit	BIOzym
T4 DNA Ligase	Stratagene, La Jolla
	Pharmacia

Die nicht genannten Chemikalien und Hilfsmittel stammten von den Firmen AppliChem, Boehringer Ingelheim, Merck, Roche Diagnostics, Roth, Sigma und Serva. Bestandteile für Nährmedien wurden von den Firmen Bacto, Difco und Oxoid bezogen. Restriktionsendonukleasen waren von den Firmen Boehringer Ingelheim, MBI Fermentas, Eurogentec, New England Biolabs, Stratagene und USB.

## Synthetische Oligonukleotide

**Tabelle 2.** Synthetische Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden

Name	Oligonukleotid-Sequenz*	Position
BamD	GTGCGGGATCCATGGCCCCACC	4301-4322 <sup>a</sup>
HinD	GAGCCGTTCAAGCTTTCACACCATCTCC	5964-5938 <sup>a</sup>
BamE	GAGATGGTGGGATCCATGGAACGGCTC	5938-5964 <sup>a</sup>
HinE	GTAAGTGAAGCTTTTATCGCTCATTGG	6544-6518 <sup>a</sup>
mcF-Bam-02	CAACGGAGTGGGATCCATGAGCGATAATCTG	6506-6535 <sup>a</sup>
mcF-Hind-02	GGTCGTCCACAAGCTTCATCCATTATCGC	7181-7157 <sup>a</sup>
mcG-Bam	GGCGAGGATCCATGTTCTCTGTGG	7155-7167 <sup>a</sup>
mcG-Hind	CCATTTAAAGCTTGGGACATCAGCG	7436-7408 <sup>a</sup>
mcC-Bam-3800	TTTCGAAGGATCCATGAGTGTCAAAGAC	3800-3745 <sup>a</sup>
mcC-Hind-2632	GAGCTAAGCTTCATGCTTTATCATCC	2632-2657 <sup>a</sup>
N-His-B	GGATGAGGATCCATGACGAACAGC	2658-2634 <sup>a</sup>
N-His-H	GGCTAAAGCTTCAAGAAAGG	1592-1611 <sup>a</sup>
pmcD-Bam	CGTGTTGGATCCGCAACCGTTTCACC	4155-4180 <sup>a</sup>
HinF	CGTCCACAAGCTTGGTACCTTATCGC	7181-7156 <sup>a</sup>
HinG	CCATTTAAAGCTTGGTACCTCAGCGTTTC	7436-7409 <sup>a</sup>
mcA-NcoI	TGAACCATGGTTGATCTGGG	4093-4112 <sup>a</sup>
mcD-Stop-XbaI	GATGAGCCGTTCTAGATGTACACCATCTCC	5967-5937 <sup>a</sup>
mcE-Stop-XbaI	CGTAAGTGTCTAGATTATCGCTCATTGG	6545-6528 <sup>a</sup>
mcF-Stop-XbaI	CACGAGGAATCTAGATTATCGCCCCGCTGC	7177-7147 <sup>a</sup>
bgaH-Seq2	GCCTCGGCCATCTGACTGAT**	2443-2421 <sup>b</sup>
QE-8-1	CACAGAATTCATTAAAGAGG**	84-103 <sup>c</sup>
QE-8-2	GTTCTGAGGTCATTACTGG**	208-190 <sup>c</sup>
Universal	TTGTAAAACGACGGCCAGT**	622-640 <sup>d</sup>
Revers	CACACAGGAAACAGCTATGA**	800-819 <sup>d</sup>

\* Unterstrichene oder kursiv geschriebene Sequenzen markieren Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme

\*\* Oligonukleotide mit 5'-Infrarot-Farbstoff-Modifikation für die DNA-Sequenzbestimmung

<sup>a</sup> Bindestellen innerhalb der mc-vac-Sequenz (Genbank accession number X64701)

<sup>b</sup> Bindestelle innerhalb der bgaH-Sequenz (Genbank accession number U70664)

<sup>c</sup> Bindestellen innerhalb des Plasmidvektors pQE8 (Qiagen)

<sup>d</sup> Bindestellen innerhalb des Plasmidvektors pBluescript II SK(+) (Stratagene)



## Verwendete Organismen

<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> Xl1-Blue	Bullock <i>et al.</i> , 1987
<i>E. coli</i> Top10F <sup>+</sup>	Invitrogen, USA
<i>E. coli</i> GM1674 (dam <sup>-</sup> )	Palmer & Marinus, 1994
<i>E. coli</i> M15	Qiagen GmbH, Hilden
<i>Haloferax mediterranei</i> DSM1411	Rodriguez-Valera <i>et al.</i> 1980 und 1983
<i>Haloferax volcanii</i> WFD11	Cline <i>et al.</i> , 1989

## Verwendete Plasmidvektoren (Antibiotika-Resistenzen)

pBluescript II SK(+) (Ampicillin)	Stratagene, La Jolla
pBluescript II KS(+) (Ampicillin)	Stratagene, La Jolla
pUC19 (Ampicillin)	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pQE8 (Ampicillin)	Qiagen GmbH, Hilden
pREP-4 (Kanamycin)	Qiagen GmbH, Hilden
pWL102 (Ampicillin, Mevinolin)	Lam & Doolittle, 1989
pJAS35 (Ampicillin, Novobiocin)	Pfeifer <i>et al.</i> , 1994; Soppa, nicht publiziert
pMDS20 (Ampicillin, Novobiocin)	Holmes <i>et al.</i> , 1991

## Anzucht von *E. coli*

Die Anzucht von *Escherichia coli* erfolgte aerob bei 37 °C in LB-Medium (Sambrook & Russel, 2001). Flüssigkulturen wurden bei 220 upm auf einem Schüttler inkubiert. Zur Selektion auf Transformanten mit Ampicillin-Resistenz wurden 100 µg/ml Ampicillin zugegeben. Die Selektion auf Transformanten mit Kanamycin-Resistenz erfolgte mit 25 µg/ml Kanamycin.

## Anzucht von *Haloferax mediterranei*

*Hf. mediterranei* wurde in Vollmedium (VM) mit 15% und 25% Gesamtsalz (vorwiegend NaCl) angezogen. Das Nährmedium enthielt 150 mM MgSO<sub>4</sub>, 40 mM KCl, 10 nM MnCl<sub>2</sub>, 25 mM Tris-HCl pH 7,2, 0,05% (w/v) CaCl<sub>2</sub>, 0,5% (w/v) Trypton, 0,3% (w/v) Hefeextrakt und je nach gewünschter Salzkonzentration 1,4 M NaCl (12% Salz), 1,9 M NaCl (15% Salz) oder 3,6 M NaCl (25% Salz). Flüssigkulturen wurden bei 37 °C und 200 upm auf einem Schüttler

angezogen, während Kolonien auf festem Medium bei 42 °C angezogen wurden, das 1,8% (w/v) Agar enthielt.

### **Anzucht von *Haloferax volcanii***

*Hf. volcanii* wurde im gleichen Vollmedium und unter den gleichen Bedingungen wie *Hf. mediterranei* angezogen. Die Medien enthielten jedoch stets 3 M NaCl (21,6% Salz). Zur Selektion auf Transformanten mit Mevinolin-Resistenz wurden 6 µg/ml Mevinolin zugegeben. Die Selektion auf Transformanten mit Novobiocin-Resistenz erfolgte mit 0,2 µg/ml Novobiocin.

### **Herstellung von halobakteriellen Glycerinkulturen**

Für die Herstellung von Glycerinkulturen zur Aufbewahrung halobakterieller Transformanten bei -70 °C wurden diese in Vollmedium mit 3 M NaCl und entsprechenden Antibiotika bis zur spätexponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600} = 0,6-1,0$ ) kultiviert. Dann wurden 700 µl Kultur mit 300 µl einer 50%igen Glycerinlösung (50% (v/v) Glycerin, 3 M NaCl, 150 mM  $MgSO_4$ , 40 mM KCl) versetzt, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

### **Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Technik der Polymerase-Kettenreaktion (Saiki *et al.*, 1988) wurde angewandt, um DNA-Fragmente der mc-vac-Region zu amplifizieren und künstliche Restriktionsschnittstellen für die Klonierung mittels Plasmidvektoren einzuführen. Die PCR wurde in einem Volumen von je 50 µl in einem rechnergesteuerten Thermostaten (Hybaid Omni Gene, MWG-Biotech bzw. Robocycler Gradient 40, Stratagene) durchgeführt.

Im ersten Zyklus wurden die DNA-Stränge 5 min bei 94 °C denaturiert, die Anlagerung der Oligonukleotide an die Matrize erfolgte je nach GC-Gehalt und Länge der Oligonukleotide, die als Primer eingesetzt wurden, für 1 min bei 50-60 °C. Die Polymerisation erfolgte für 1 min pro kb zu polymerisierender DNA bei 72 °C. Bei den 30-35 folgenden identischen Zyklen wurde die Denaturierungszeit auf 10 sec (Hybaid Omni Gene) bzw. 45 sec (Robocycler Gradient 40) reduziert. In einem Abschlusszyklus wurde durch Erhöhung der Polymerisationszeit auf 10 min erreicht, dass alle Matrizenstränge nach Anlagerung der Primer verlängert wurden.

Zusammensetzung der PCR-Ansätze:

35 ng genomische DNA von *Hf. mediterranei* pro 50 µl-Ansatz

1/10 Volumen 10x Reaktionspuffer

3 mM MgCl<sub>2</sub>

0,2 mM dNTPs

je 1 µM Primer

0,03 U/µl DAp Goldstar DNA-Polymerase

evtl. Zugabe von 5-10 mM NH<sub>4</sub>Cl zur Erhöhung der Spezifität der PCR

Zugabe von sterilem doppelt deionisiertem H<sub>2</sub>O bis zum Endvolumen 50 µl

## Molekularbiologische Standardtechniken

Hydrolytische Spaltungen von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurden gemäß den Empfehlungen der Hersteller durchgeführt. Für partielle Restriktionen wurde das entsprechende Restriktionsenzym nur 5-15 min mit der zu hydrolysierenden DNA inkubiert und dann mittels Phenol-Chloroform-Extraktion entfernt.

Die analytische und präparative Auftrennung verschiedener DNA-Fragmente erfolgte elektrophoretisch mit 1-2%igen Agarosegelen in 1x TBE-Puffer (Tris/Borat/EDTA-Puffer; Sambrook & Russel, 2001) für analytische Gele und 1x TAE-Puffer (Tris/Acetat/EDTA-Puffer; Sambrook & Russel, 2001) für präparative Gele. Die Visualisierung der DNA-Fragmente erfolgte durch Inkubation mit Ethidiumbromid und Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm (Sambrook & Russel, 2001).

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde jeweils nach dem Protokoll der entsprechenden Hersteller alternativ mit der Gene Clean-Methode (Vogelstein & Gillespie, 1979; Bio 101 Inc., USA), mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) oder bei DNA-Fragmenten kleiner 1000 bp mit dem Ultrafree-DA-System für DNA-Extraktion (Millipore) durchgeführt.

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Protein-DNA-Gemischen erfolgte mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließender Fällung mit Natriumacetat und Ethanol bzw. Isopropanol (Sambrook & Russel, 2001).

Für die Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren wurde mit kompatiblen Restriktionsenzymen behandelte Vektor- und Insert-DNA in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:10 an freien Enden zusammengegeben und über Nacht bei 16 °C mit T4-DNA-Ligase inkubiert. Zur besseren Ausbeute an richtig ligierten Fragmenten wurden bei Bedarf die 5'-

Phosphate der Plasmidvektoren vor der Ligation mit alkalischer Phosphatase entfernt, um eine Religation von unvollständig geschnittenen Vektormolekülen zu verhindern.

Die Transformation von *E. coli* erfolgte mit kompetenten Zellen, die nach der RbCl<sub>2</sub>-Methode (<http://research.nwfsc.noaa.gov/protocols/rbcl.html>) hergestellt wurden. Die Aufnahme der DNA erfolgte durch Hitzeschock der Zellen nach den gängigen Methoden (Sambrook & Russel, 2001).

Für die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* wurden Protokolle der Hersteller Qiagen (QIAGEN Tip-20 und QIAprepSpin), Macherey-Nagel (NucleoSpin) und Invitrogen (Concert Rapid Plasmid Miniprep) benutzt.

### **Transformation von *Haloferax volcanii***

Für die Transformation von *Hf. volcanii* stehen mehrere Plasmidvektoren zur Verfügung, die jeweils einen Replikationsursprung für die Vermehrung in *E. coli* und einen Replikationsursprung für die Vermehrung in *Hf. volcanii* besitzen. Plasmide mit verschiedenen halobakteriellen Replikationsursprüngen und Resistenzgenen ermöglichen die gleichzeitige Transformation von *Hf. volcanii* mit zwei Plasmidkonstrukten. Die Herstellung von DNA-Konstrukten, welche die gesamte mc-vac-Region, Teile der mc-vac-Region oder Fusionskonstrukte mit Teilen der mc-vac-Region und dem *bgaH*-Leserahmen enthielten, erfolgte mit dem Vektorplasmid pWL102 (Lam & Doolittle, 1989). Die Selektion von halobakteriellen Transformanten, die pWL102-Konstrukte enthielten, erfolgte durch die Zugabe von 6 µg/ml Mevinolin.

Für die Expression einzelner Leserahmen oder mehrerer aufeinanderfolgender Leserahmen ohne eigenen Promotor wurde das Vektorplasmid pJAS35 benutzt (Pfeifer *et al.*, 1994; Soppa, nicht publiziert). Die Fusion der jeweiligen Leserahmen mit dem im pJAS35 enthaltenen Ferredoxin-Promotor (*fdx*-Promotor) (Pfeifer *et al.*, 1993) bewirkte eine frühe und starke Expression bereits in der frühen exponentiellen Wachstumsphase. Die Selektion von halobakteriellen Transformanten, die pJAS35-Konstrukte enthielten, erfolgte durch die Zugabe von 0,2 µg/ml Novobiocin.

Einzelne Gene wurden in dem Vektorplasmid pMDS20 (Holmes *et al.*, 1991) exprimiert. Die Selektion von halobakteriellen Transformanten, die pMDS20-Konstrukte enthielten, erfolgte durch die Zugabe von 0,2 µg/ml Novobiocin.

Für die Transformation von *Hf. volcanii* WFD11 wurden Plasmidkonstrukte verwendet, die durch *E. coli* GM1674 (dam-) passagiert waren, um eine halobakterielle Restriktionsbarriere zu vermeiden (Holmes *et al.*, 1991). Die Transformation wurde nach dem Protokoll von Pfeifer & Ghahraman (1993) durchgeführt. Die Anwesenheit der verschiedenen Kon-

strunkte in den halobakteriellen Transformanten wurde durch Restriktionsanalyse mit den isolierten Plasmiden und, falls erforderlich, auch mittels Southern-Analyse nachgewiesen.

### **Konstrukte für die Transformation von *Hf. volcanii***

#### Subfragmente der mc-vac-Region in pWL102 und pMDS20:

##### **A**

enthält das 623 bp *EcoRI-MluI*-Fragment mit mc-*gvpA* sowie Teilen von mc-*gvpC* und mc-*gvpD* in pWL102 (Röder & Pfeifer, 1996).

##### **ADE**

enthält das 3310 bp *EcoRI-ClaI*-Fragment mit mc-*gvpADE* sowie Teilen von mc-*gvpC* und mc-*gvpF* in pWL102 (Röder & Pfeifer, 1996).

##### **AΔDE**

ist eine Variante von ADE mit einer 918 bp-*XhoI*-Deletion in mc-*gvpD* (Röder & Pfeifer, 1996).

##### **DE<sup>mcD</sup>**

enthält ein 2377 bp-Fragment mit mc-*gvpDE* unter Kontrolle des mc-*gvpD*-Promotors in der *Bam*HI- und *Hind*III-Schnittstelle von pMDS20. Mit den Oligonukleotiden pmcD-Bam und HinE wurde mittels PCR ein 2389 bp-Fragment erzeugt, welches mit Hilfe der künstlich eingefügten Schnittstellen für *Bam*HI und *Hind*III in das halobakterielle Vektorplasmid pMDS20 inseriert wurde.

##### **ΔD**

enthält das 9259 bp *Pst*I-*Bgl*II-Fragment mit der mc-vac-Region, die eine 918 bp-Deletion in mc-*gvpD* enthält (Englert *et al.*, 1992b).

##### **E-N**

enthält das 5215 bp *Mro*I-*Cla*I-Fragment mit mc-*gvpNCADE* sowie Teilen von mc-*gvpO* und mc-*gvpF* in pWL102 (Röder, 1997).

**F-A**

enthält das 3496 bp-*EcoRI-NcoI*-Fragment mit *mc-gvpADEF* sowie Teilen von *mc-gvpC* und *mc-gvpG* in pWL102 (Röder, 1997).

**G-A**

enthält das 3496 bp-*EcoRI-SacII*-Fragment mit *mc-gvpADEFG* sowie Teilen von *mc-gvpC* und *mc-gvpH* in pWL102 (Röder, 1997).

**G-C**

enthält das 5250 bp *SphI-SacII*-Fragment mit *mc-gvpCADEFG* sowie Teilen von *mc-gvpN* und *mc-gvpH* in pWL102 (Röder, 1997).

**G-N**

enthält das 6245 bp *MroI-SacII*-Fragment mit *mc-gvpNCADEFG* sowie Teilen von *mc-gvpO* und *mc-gvpH* in pWL102 (Röder, 1997).

**mc (BN)**

enthält das 9487 bp *NheI-BglI*-Fragment mit der gesamten *mc-vac*-Region in pWL102 (Englert *et al.*, 1992b).

**gvp-Leserahmen in dem Expressionsvektor pJAS35:****D<sup>ex</sup>**

enthält ein 1651 bp PCR-Fragment mit dem Leserahmen von *mc-gvpD*, das mit den künstlich eingeführten Schnittstellen für *NcoI* und *Acc65I* in pJAS35 inseriert wurde (Röder, 1997).

**DE<sup>ex</sup>**

enthält ein 2215 bp-Fragment mit *mc-gvpDE* in der *NcoI*- und *Acc65I*-Schnittstelle von pJAS35. Mit den Oligonukleotiden BamD und HinE wurde mittels PCR ein 2243 bp-Fragment erzeugt, welches mit Hilfe der künstlich eingefügten Schnittstellen für *BamHI* und *HindIII* in das Vektorplasmid pBluescript II SK (+) inseriert wurde. Das DE-Konstrukt wurde mit Hilfe der künstlich eingefügten Schnittstelle für *NcoI* und der *Acc65I*-Schnittstelle im pBluescript in den halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35 überführt. Dabei wurde das Startcodon von *gvpD* direkt in die *NcoI*-Schnittstelle des pJAS35 eingefügt. Da der Leserahmen von *gvpE* ebenfalls eine Erkennungssequenz für *Acc65I* besitzt, wurde für den Transfer

des DE-Konstrukts das Konstrukt E<sup>ex</sup> (s.o.) verwendet. Dabei wurde ein 1997 bp *NcoI*-*Acc65I*-Fragment mit *gvpD* und dem 5'-Bereich von *gvpE* bis zur *Acc65I*-Schnittstelle in ein *NcoI*-*Acc65I*-pJAS35-Fragment inseriert, das den 3'-Bereich von *gvpE* ab der *Acc65I*-Schnittstelle enthielt.

### **DEF<sup>ex</sup>**

enthält ein 2850 bp-Fragment mit mc-*gvpDEF*, das mit Schnittstellen für *NcoI* und *Acc65I* in pJAS35 inseriert wurde. Mit den Oligonukleotiden BamD und HinF wurde mittels PCR ein 2880 bp-Fragment erzeugt, welches mit Hilfe der künstlich eingefügten Schnittstellen für *BamHI* und *HindIII* in das Vektorplasmid pBluescript II SK (+) inseriert wurde. Das DEF-Konstrukt wurde mit Hilfe der künstlich eingefügten Schnittstelle für *NcoI* und der *Acc65I*-Schnittstelle im pBluescript in den halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35 überführt. Dabei wurde das Startcodon von *gvpD* direkt in die *NcoI*-Schnittstelle des pJAS35 eingefügt. Da der Leserahmen von *gvpE* ebenfalls eine Erkennungssequenz für *Acc65I* besitzt, wurde für den Transfer des DEF-Konstrukts eine partielle Restriktion mit *Acc65I* durchgeführt und das entsprechende 2850 bp-Fragment isoliert.

### **DEFG<sup>ex</sup>**

enthält ein 3105 bp-Fragment mit mc-*gvpDEFG* in der *NcoI*- und *Acc65I*-Schnittstelle von pJAS35. Mit den Oligonukleotiden BamD und HinG wurde mittels PCR ein 2280 bp-Fragment erzeugt, welches mit Hilfe der künstlich eingefügten Schnittstellen für *BamHI* und *HindIII* in das Vektorplasmid pBluescript II SK (+) inseriert wurde. Da der Leserahmen von *gvpG* ebenfalls eine Erkennungssequenz für *NcoI* besitzt und somit die Benutzung der *NcoI*-Schnittstelle im pJAS35 erschwert, wurde für die Herstellung des DEFG-pJAS35-Konstrukts das Konstrukt D<sup>ex</sup> (s.o.) verwendet. Dabei wurde ein 2646 bp-*EcoRV*-*Acc65I*-Fragment mit dem 3'-Bereich von *gvpD* ab der *EcoRV*-Schnittstelle und *gvpEFG* in ein *EcoRV*-*Acc65I*-pJAS35-Fragment inseriert, das den 5'-Bereich von *gvpD* bis zur *EcoRV*-Schnittstelle enthielt. Da der Leserahmen von *gvpE* ebenfalls eine Erkennungssequenz für *Acc65I* besitzt, wurde für den Transfer des DEFG-Konstrukts eine partielle Restriktion mit *Acc65I* durchgeführt und das entsprechende 2646 bp-Fragment isoliert.

**$\Delta DE^{ex}$** 

ist eine Variante von  $DE^{ex}$  mit einer 918 bp-*XhoI*-Deletion in *mc-gvpD*. Für die Herstellung des 1325 bp PCR-Produkts, das *mc-gvp $\Delta DE$*  enthält, wurde das  $\Delta D$ -Konstrukt als Matrize für die PCR benutzt.

 **$\Delta DEF^{ex}$** 

ist eine Variante von  $DEF^{ex}$  mit einer 918 bp-*XhoI*-Deletion in *mc-gvpD*. Für die Herstellung des 1962 bp PCR-Produkts, das *mc-gvp $\Delta DEF$*  enthält, wurde das  $\Delta D$ -Konstrukt als Matrize für die PCR benutzt.

 **$E^{ex}$** 

enthält ein 597 bp PCR-Fragment mit dem Leserahmen von *mc-gvpE* in pJAS35 (Röder, 1997). Da eine Inserierung des PCR-Produkts in pJAS35 über die Schnittstellen *NcoI* und *Acc65I* aufgrund der innerhalb von *gvpE* natürlich vorkommenden *Acc65I*-Schnittstelle nicht möglich war, wurde über die *NcoI*-Schnittstelle und die geglättete *Acc65I*-Schnittstelle von pJAS35 ligiert (Röder, 1997).

 **$F^{ex}$** 

enthält ein 654 bp PCR-Fragment mit dem Leserahmen von *mc-gvpF*, das mit den künstlich eingeführten Schnittstellen für *BspHI* und *Acc65I* in pJAS35 inseriert wurde (Röder, 1997).

 **$G^{ex}$** 

enthält ein 267 bp PCR-Fragment mit dem Leserahmen von *mc-gvpG*, das mit den künstlich eingeführten Schnittstellen für *AflIII* und *Acc65I* in pJAS35 inseriert wurde (Röder, 1997).

 **$N^{ex}$** 

enthält ein 1055 bp PCR-Fragment mit dem Leserahmen von *mc-gvpF*, das mit den künstlich eingeführten Schnittstellen für *BspHI* und *Acc65I* in pJAS35 inseriert wurde (Röder, 1997).

***bgaH*-Fusionskonstrukte in pWL102:*****mcA-bgaH***

enthält das Fusionskonstrukt aus dem 127 bp *XbaI-NcoI*-*mcA*-Promotor-Fragment (PCR-Produkt von Position 4213-4093) und dem 2203 bp *NcoI-BamHI-bgaH*-Fragment (PCR-Produkt von Position 2356-4571) in pWL102 (Gregor & Pfeifer, 2001).



**mcA-*bgaH*-D**

enthält das Fusionskonstrukt aus einem 1874 bp PCR-Produkt, das den mcA-Promotor sowie *gvpD* mit dem *gvpD*-Promotor enthält, und dem 2203 bp *NcoI*-*BamHI*-*bgaH*-Fragment in pWL102. Das 1874 bp PCR-Produkt wurde mit den Oligonukleotiden mcA-*NcoI* und mcD-Stop-*XbaI* erzeugt und mit Hilfe der künstlich eingefügten Schnittstellen für *XbaI* und *NcoI* in ein Konstrukt inseriert, welches das mcA-*bgaH*-Fragment in pBluescript II SK (+) (Gregor & Pfeifer, 2001) enthielt. Dabei wurde das *XbaI*-*NcoI*-mcA-Promotor-Fragment in dem pBluescript-Konstrukt durch das *XbaI*-*NcoI*-Fragment ersetzt, das den mcA-Promotor sowie mc-*gvpD* unter Kontrolle des mc-*gvpD*-Promotors enthält. Das mcA-*bgaH*-D-Konstrukt wurde mit Hilfe der Schnittstellen für *XbaI* und *BamHI* in den halobakteriellen Shuttlevektor pWL102 transferiert.

**mcA-*bgaH*-DE**

enthält das Fusionskonstrukt aus einem 2452 bp PCR-Produkt, das den mcA-Promotor sowie *gvpDE* mit dem *gvpD*-Promotor enthält, und dem 2203 bp *NcoI*-*BamHI*-*bgaH*-Fragment in pWL102. Die Herstellung des mcA-*bgaH*-DE-Konstrukts erfolgte analog der Herstellung des mcA-*bgaH*-D-Konstrukts. Für die Amplifizierung des *gvpDE*-Fragments wurden die Oligonukleotide mcA-*NcoI* und mcE-Stop-*XbaI* verwendet.

**mcA-*bgaH*-DEF**

enthält das Fusionskonstrukt aus dem 3084 bp PCR-Produkt, das den mcA-Promotor sowie *gvpDEF* unter Kontrolle des *gvpD*-Promotors enthält, und dem 2203 bp *NcoI*-*BamHI*-*bgaH*-Fragment in pWL102. Die Herstellung des mcA-*bgaH*-DEF-Konstrukts erfolgte analog der Herstellung des mcA-*bgaH*-D-Konstrukts. Für die Amplifizierung des *gvpDE*-Fragments wurden die Oligonukleotide mcA-*NcoI* und mcF-Stop-*XbaI* verwendet.

**mcA-*bgaH*- $\Delta$ DE**

ist eine Variante von mcA-*bgaH*-DE mit einer 918 bp-*XhoI*-Deletion in mc-*gvpD*. Für die Herstellung des 1534 bp PCR-Produkts, das mc-*gvp $\Delta$ DE* enthält, wurde das  $\Delta$ D-Konstrukt als Matrize für die PCR benutzt.

### **mcA-*bgaH*- $\Delta$ DEF**

ist eine Variante von mcA-*bgaH*-DEF mit einer 918 bp-*XhoI*-Deletion in mc-*gvpD*. Für die Herstellung des 2166 bp PCR-Produkts, das mc-*gvp* $\Delta$ DEF enthält, wurde das  $\Delta$ D-Konstrukt als Matrize für die PCR benutzt.

### **Plasmidisolierung aus *Hf. volcanii***

Die Plasmid-Isolierung aus *Hf. volcanii* wurde mit dem Concert Rapid Plasmid Miniprep-Kit (Invitrogen) durchgeführt. Für die Anwendung bei Halobakterien wurde das Protokoll leicht verändert: Für die Plasmidisolierung wurden 3 ml einer stationär wachsenden Kultur von *Hf. volcanii* abzentrifugiert und in 250  $\mu$ l Halobakterien-Resuspendierungspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 50 mM Glucose, 1 M NaCl) aufgenommen. Nach Zugabe des Neutralisierungspuffers (M3-Puffer) wurde zusätzlich 5 min auf Eis inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgten nach den Angaben des Herstellers.

### **Sequenzbestimmung von DNA-Fragmenten**

Die Bestimmung von DNA-Sequenzen wurde mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger durchgeführt (Sanger *et al.*, 1977). Die Sequenzreaktion wurde mit dem *SequiTherm EXCEL* II Long-Read Sequencing Kit-LC (BIOzym) nach den Angaben des Herstellers in einem rechnergesteuerten Thermostaten (Robocycler Gradient 40, Stratagene) durchgeführt. Für die Sequenzbestimmung von Fragmenten in pBluescript II wurden die 5'-fluoreszenzmarkierten (IRD 800) Oligonukleotide Universal und Revers (MWG) benutzt. Die DNA-Sequenzbestimmung von Fragmenten in dem Vektorplasmid pQE8 erfolgte mit den 5'-fluoreszenzmarkierten (IRD 800) Oligonukleotiden QE-8-1 und QE-8-2. Für die Sequenzbestimmung der Promotorregionen in den Fusionskonstrukten aus dem *bgaH*-Leserahmen und verschiedenen Fragmenten aus der mc-vac-Region wurde das 5'-fluoreszenzmarkierte (IRD 800) Oligonukleotid bgaH-Seq2 verwendet. Die Auftrennung und Detektion der Fragmente erfolgte mit einem LICOR DNA Sequencer 4000 bei 1200 V, 35 mA und 50 °C für 7 h.

### **Nachweis von DNA-Fragmenten mittels Southern-Analyse**

Für die Detektion von DNA-Sequenzen mittels Southern-Analyse wurden die entsprechenden Konstrukte mit geeigneten Restriktionsenzymen hydrolysiert und die resultierenden DNA-Fragmente elektrophoretisch mit 1-2%igen Agarosegelen in 1x TAE-Puffer aufgetrennt. Die Agarosegele wurden anschließend für 10 min in 0,25 M HCl, für 30 min in 0,5 M NaOH/1,5

M NaCl und für 30 min in 1,5 M NaCl/0,5 M Tris-HCl pH 7,5 geschwenkt. Danach wurden die DNA-Fragmente mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran übertragen (Southern, 1975; Sambrook & Russel, 2001). Als Transferpuffer wurde 20x SSC (3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat pH 7,0) eingesetzt. Die kovalente Bindung der DNA-Fragmente auf der Nylonmembran erfolgte für 2 h bei 80 °C. Die Detektion bestimmter DNA-Fragmente wurde mit Digoxigenin-markierten DNA-Fragmenten durchgeführt. Die Herstellung der DNA-Sonden sowie die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte mit dem DIG DNA Labelling Kit und dem DIG Luminescent Detection Kit nach Angaben des Herstellers (Roche Diagnostics, Mannheim).

### Isolierung halobakterieller RNA

Gesamt-RNA aus *Hf. mediterranei* und Transformanten von *Hf. volcanii* wurde mit der Methode von Chomczynski & Sacchi (1987) oder mit dem RNeasy Kit (Qiagen) isoliert. Für Proben aus der exponentiellen Wachstumsphase wurden 30 ml Kultur mit einer  $OD_{600} = 0,2$  bis 0,4 und für Proben aus der stationären Wachstumsphase wurden 3 bis 4,5 ml Kultur mit einer  $OD_{600} \geq 2$  abzentrifugiert.

Bei der RNA-Isolierung mit dem RNeasy Kit wurde anschließend noch 30 min mit DNase I inkubiert, um noch vorhandene DNA-Moleküle zu hydrolysieren. Zur Beurteilung der Qualität der RNA anhand der Schärfe der Banden der 16S- und 23S-rRNA wurde ein 2 µl-Aliquot mit 8 µl denaturierendem RNA-Mix (250 µl deionisierendes Formamid, 83 µl 37%iger Formaldehyd, 50 µl 1x MOPS-Gelpuffer pH 8,0, 50 µl 10x DNA-Auftragspuffer) gemischt, 10 min bei 65 °C denaturiert und elektrophoretisch auf einem 1,2%igen Agarosegel aufgetrennt. Durch Anfärben mit Toluidinblau (0,1% Toluidinblau, 20% (v/v) Ethanol in doppelt deionisiertem H<sub>2</sub>O) und Entfärben mit 20% Ethanol wurde die 16S- und 23S-rRNA sichtbar.

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch ermittelt, indem die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und die Konzentration nach der Formel, dass 25 OD-Einheiten einer Konzentration von 1 mg/ml RNA entspricht, berechnet wurde.

### Nachweis von RNA mittels Northern-Analyse

Für Northern-Analysen wurden 5 bzw. 10 µg Gesamt-RNA aus *Hf. volcanii* bzw. *Hf. mediterranei* in denaturierenden, formaldehydhaltigen, 1,2%igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels Kapillarblot auf Nylonmembranen transferiert (Ausubel *et al.*, 1988). Als Transferpuffer wurde 20x SSC (3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat pH 7,0) einge-

setzt. Die kovalente Bindung der RNA-Fragmente auf der Nylonmembran erfolgte für 2 h bei 80 °C. Zur Beurteilung der Qualität der RNA anhand der Schärfe der Banden der 16S- und 23S-rRNA wurden diese durch Anfärben mit Methylblau (0,04% (w/v) Methylblau, 0,5 M Natriumacetat, pH 5,5) sichtbar gemacht und anschließend wieder mit deionisiertem H<sub>2</sub>O entfärbt.

Die Detektion bestimmter RNA-Fragmente wurde mit strangspezifischen Digoxigenin-markierten RNA-Sonden durchgeführt, die mit dem DIG RNA Labelling Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach dem T3/T7 Polymerase-System von Stratagene hergestellt wurden. Dazu wurden Konstrukte benutzt, die bestimmte mc-vac-Sequenzen in dem Vektorplasmid pBluescript II SK(+) bzw. KS(+) enthielten.

#### Herstellung strangspezifischer RNA-Sonden:

##### **A-Sonde**

Die Herstellung der strangspezifischen Sonde, die mit *gvpA*-mRNA hybridisiert, erfolgte mit einem Konstrukt, das ein 367 bp-*EcoRI*-*XcmI*-Fragment mit mc-*gvpA* in pBluescript II KS(+) enthält (Röder & Pfeifer, 1996) durch die T3 RNA-Polymerase.

##### **5'-D-Sonde**

Die Herstellung der strangspezifischen Sonde, die mit *gvpD*-mRNA hybridisiert, erfolgte mit einem Konstrukt, das ein 304 bp-*MluI*-*XhoI*-Fragment mit einem Teil aus dem 5'-Bereich von *gvpD* in pBluescript II KS(+) enthält (Röder & Pfeifer, 1996) durch die T7 RNA-Polymerase.

##### **D/E-Sonde**

Die Herstellung der strangspezifischen Sonde, die mit *gvpDE*-mRNA hybridisiert, erfolgte mit einem Konstrukt, das ein 580 bp-*NruI*-*KpnI*-Fragment mit einem Teil aus dem 3'-Bereich von mc-*gvpD* und den 356 bp langen 5'-Bereich von *gvpE* in pBluescript II KS(+) enthält (Röder, 1997) durch die T3 RNA-Polymerase.

Die Hybridisierung der Nylonmembranen erfolgte wie bei Ausubel *et al.* (1988) beschrieben. Die Hybridisierungslösung enthielt jedoch zusätzlich 10% (w/v) Dextransulfat, 1% SDS und 0,5% Magermilchpulver. Die Vorhybridisierung erfolgte für 2 h bei 42 °C, die Hybridisierung mit der strangspezifischen RNA-Sonde über Nacht bei 42 °C. Die Membran wurde mit 0,2x SSC, 0,1% SDS für 20 min bei 55 °C und jeweils 30 min mit der gleichen Lösung bei 60 °C

und 65 °C gewaschen. Die Detektion der Signale erfolgte mit dem DIG Luminescent Detection Kit nach Angaben des Herstellers (Roche Diagnostics, Mannheim).

### **Isolierung von Proteinen aus Halobakterien für Western-Analysen**

Für die Isolierung der löslichen Fraktion der Gesamtproteine aus *Hf. mediterranei* oder Transformanten von *Hf. volcanii* wurden während des Wachstums Proben entnommen und bei 12000 g abzentrifugiert. Dabei war das Volumen an zu entnehmender Kultur variabel, um zu allen Zeitpunkten ungefähr gleich viel Zellmaterial zu erhalten, und variierte in der Größenordnung von 40 ml (frühe exponentielle Kultur) bis 3 ml (stationäre Kultur). Die Lyse der Zellen wurde durch deren Aufnahme in 400 µl TE mit 1 µg/ml DNase I bewerkstelligt. Die Suspension wurde dann über Nacht gegen 10 mM Tris-HCl, pH 7,2 dialysiert. Die Zellmembran und andere unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation für 30 min bei 12000 g und 4 °C von den löslichen Proteinen getrennt.

Die Konzentration der Proteine in der löslichen Fraktion wurde nach der Bradford-Methode bestimmt.

### **Isolierung von Proteinen aus *Hf. mediterranei* für in vitro-Studien**

Für die Isolierung von Proteinen aus *Hf. mediterranei* für in vitro-Studien wurde *Hf. mediterranei* in 50 ml Vollmedium mit 25% Salz angezogen und bis zu einer OD<sub>600</sub> ≥3 bei 200 upm und 42 °C geschüttelt. Die stationär gewachsenen Zellen wurden 20 min bei 10000 g und 4 °C sedimentiert und in 5 ml Lysepuffer für *Hf. mediterranei* (2,5 M KCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Glycerin, 50 mM Tris-HCl pH 7,2, 1 mM EDTA bzw. 0,2% Triton X-100) resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte durch 5-10 minütige Ultraschallbehandlung auf Eis mit einem Ultraschallgerät mit Mikrospritze (Branson Ultrasonic, USA). Die Zellmembran und andere unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation für 20 min bei 12000 g und 4 °C von den löslichen Proteinen getrennt. Die Konzentration der Proteine wurde nach der Bradford-Methode bestimmt.

### **Proteinbestimmung nach Bradford**

Für die Proteinbestimmung nach der Bradford-Methode wurden 20 µl einer Proteinlösung in einer Halbmikroküvette mit 980 µl Bradfordreagenz (0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250, 8,5% (v/v) Phosphorsäure, 4,75% (v/v) EtOH) versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde bei 595 nm die Extinktion bestimmt und mit Hilfe einer

Eichreihe mit Rinderserumalbumin (BSA) von 0,1 bis 1,0 mg/ml Protein die Proteinkonzentration der Probe berechnet.

### **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Für die analytische Auftrennung verschiedener Proteinproben wurden 12-16%ige Tricin-SDS-Polyacrylamidgele verwendet (Schägger & von Jagow, 1987). Die Proteinproben wurden vor dem Auftrag auf das Gel mit 3x SDS-Probenpuffer (0,2% Bromphenolblau, 20% Glycerin, 4% SDS, 25 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10%  $\beta$ -Mercaptoethanol) versetzt und dann 1-5 min bei 95 °C denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung fand für 2-3 h bei 110 V statt.

### **Nachweis halobakterieller Proteine mittels Western-Analyse**

Für den Nachweis halobakterieller Proteine mittels Western-Analyse wurden Proteine mit 12-16%igen Tricin-SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Nassblot nach dem von Towbin *et al.* (1979) beschriebenen Verfahren elektrophoretisch mit dem Midget MultiBlot-System (Pharmacia) auf eine Nitrocellulosemembran übertragen.

Der Transfer erfolgte für 1 h bei 4 °C und 100 V und wurde durch Anfärben der transferierten Proteine auf der Nitrocellulosemembran mit Ponceau-Rot-Lösung kontrolliert. Der Transferpuffer enthielt 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol, pH 8,3-8,6. Die Ponceau-Rot-Lösung bestand aus 0,2% (w/v) Ponceau-Rot S, 3% (w/v) Trichloressigsäure und 3% (w/v) Sulfosalicylsäure. Die Nitrocellulosemembran wurde über Nacht bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer (1% BSA bzw. 1-3% Magermilchpulver, 0,05-0,1% Tween-20 in PBS-Puffer) inkubiert. PBS-Puffer enthielt 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,2 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und 1,8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4.

Die entsprechenden Antiseren aus Kaninchen, die spezifisch mit bestimmten halobakteriellen Proteinen reagierten, wurden 1:1000 verdünnt in Blockierungslösung mit der Nitrocellulosemembran für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Penta-His-Antikörper, der in Mäuse generiert wurde (Qiagen), wurde 1:1000 verdünnt in 3% BSA, 0,05% Tween-20 in PBS-Puffer eingesetzt. Unspezifisch mit anderen Proteinen reagierende Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit 0,05-0,1% Tween-20 in PBS-Puffer für 10 min bei Raumtemperatur entfernt.

Die reagierenden Antikörper wurden mit dem ECL-System von Amersham (Amersham Pharmacia, UK) nach der Anleitung des Herstellers detektiert. Dafür wurden die Nitrocellulosemembranen mit einem Antikörper aus Esel (Amersham Pharmacia, UK) inkubiert,

der spezifisch mit IgG aus Kaninchen reagiert und mit Meerrettichperoxidase gekoppelt ist. Für den Nachweis mit dem Penta-His-Antikörper aus Maus wurde ein Zweitantikörper aus der Ziege (Biorad) benutzt, der spezifisch mit IgG aus Maus reagiert und ebenfalls mit Meerrettichperoxidase gekoppelt ist. Die Inkubation der Nitrozellulosemembran mit dem Zweitantikörper gegen Kaninchen-IgG erfolgte mit einer 1:5000-Verdünnung in Blockierungslösung für 1 h bei Zimmertemperatur. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper gegen Maus-IgG erfolgte mit einer 1:3000-Verdünnung des Antikörpers in 10% Magermilchpulver, 0,05% Tween-20 in PBS-Puffer für 1 h bei Zimmertemperatur. Die Waschschrte erfolgten jeweils wie nach Inkubation mit dem ersten Antiserum. Für die Chemolumineszenzreaktion wurde die Nitrozellulosemembran mit den Chemolumineszenzlösungen (Amersham Pharmacia, UK) nach Angaben des Herstellers für 1 min inkubiert und mit einem Röntgenfilm in verschiedenen Zeitintervallen (1-60 min) exponiert.

## Generierung von Antiseren

Die Produktion von Antiseren gegen bestimmte Gvp-Proteine wurde von Eurogentec, Seraing (Belgien) durchgeführt. Für die Generierung von Antiseren wurden Kaninchen 100 µg gereinigtes Gvp-His-Protein injiziert, das in 1 ml Puffer vorlag, der 500 µl 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 8,0 (GvpD, GvpE) bzw. 10 mM Tris-HCl pH 7,2, 2,5 M KCl (GvpF) und 500 µl Freund's Adjuvans enthielt. Die Kaninchen erhielten jeweils nach zwei, vier und acht Wochen eine Auffrischungs-Injektion (*Booster-Injektion*) mit jeweils 100 µg Protein. Vor der Erstimmunisierung sowie nach der zweiten Auffrischungsinjektion wurden geringe Mengen Antiserum isoliert und zum Testen der Antiseren für Western-Analysen eingesetzt. Das Immunisierungsprogramm wurde nach 80 Tagen beendet und das aus dem Kaninchenblut isolierte Serum für Western-Analysen eingesetzt.

Folgende Antiseren wurden in dieser Arbeit für Western-Analysen verwendet:

Antiserum	benutzt zur Detektion von	produziert in	Referenz
Anti-mc-Gasvesikel	mcGvpA	Kaninchen	Englert & Pfeifer, 1993
Anti-mcGvpC	mcGvpC	Kaninchen	Englert & Pfeifer, 1993
Anti-mcGvpD	mcGvpD	Kaninchen	diese Arbeit
Anti-mcGvpE	mcGvpE	Kaninchen	diese Arbeit
Anti-mcGvpF	mcGvpF	Kaninchen	diese Arbeit
Anti-pGvpG	mcGvpG	Kaninchen	Offner & Pfeifer, 1995

## Rekombinante Expression und Reinigung von Gvp-His-Fusionsproteinen aus *E. coli*

Bestimmte Gasvesikelproteine von *Hf. mediterranei* wurden als Fusionsproteine mit einem N-terminalen „Hexahistidin-tag“ (His-tag) in *E. coli* produziert und mittels Metallionen-affinitätschromatographie aufgereinigt. Für die chromatographische Reinigung wurde als Affinitätsmatrix Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose (nickel-nitrilotriacetic acid agarose, Ni-NTA) bzw. Zink-Nitrilotriessigsäure-Agarose (Zn-NTA) verwendet. Für die rekombinante Expression und Reinigung von Gvp-His-Fusionsproteinen wurden die entsprechenden Leserahmen mittels PCR amplifiziert und durch die Primer künstlich Schnittstellen eingefügt für die Inserierung der Leserahmen als *Bam*HI-*Hind*III-Fragmente in den His-tag-Expressionsvektor pQE8. Die Insertion in pQE8 resultierte in Fusionskonstrukten, bei denen dem entsprechenden Leserahmen am 5'-Ende eine Sequenz angefügt wurde, die für 6 Histidine kodiert.

Folgende pQE8-Konstrukte wurden in dieser Arbeit hergestellt:

Konstrukt	Oligonukleotide für die PCR	Fragmentgröße
<i>gvpD</i> -pQE8	BamD, HinD	1663
<i>gvpE</i> -pQE8	BamE, HinE	606
<i>gvpF</i> -pQE8	mcF-Bam-02, mcF-Hind-02	675
<i>gvpG</i> -pQE8	mcG-Bam, mcG-Hind	281
<i>gvpC</i> -pQE8	mcC-Bam-3800, mcC-Hind-2632	1168
<i>gvpN</i> -pQE8	N-His-B, N-His-H	1066

Für die Expression der in pQE8 inserierten *gvp*-Leserahmen wurde *E. coli* M15 [pREP4] mit den entsprechenden pQE8-Plasmidkonstrukten transformiert und in LB-Medium kultiviert, das 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin enthielt (LB Amp Kan). Die beiden Antibiotika Ampicillin und Kanamycin sorgten dafür, dass ein Selektionsdruck ausgeübt wurde, bei dem nur Zellen wachsen konnten, die sowohl das bereits in den M15-Zellen vorhandene Vektorplasmid pREP4 (vermittelt Kanamycin-Resistenz) enthielten als auch das pQE8-Plasmidkonstrukt (vermittelt Ampicillin-Resistenz) aufgenommen hatten. Das in den M15-Zellen vorhandene Plasmid pREP4 sorgt für eine konstitutive Expression des *lacI*-Gens,



wodurch die vorzeitige Expression des in pQE8-inserierten Fremdgens, welches unter der Kontrolle des *lac*-Promotor/Operator-Elements steht, verhindert wird.

Die Bildung des rekombinanten Proteins wurde mit 5 ml Übernachtskulturen der entsprechenden Transformanten, die 1:10 in 50 ml LB Amp Kan verdünnt bis zu einer  $OD_{600} \leq 0,6$  schüttelnd bei 200 upm und 37 °C inkubiert wurden, durch Zugabe von 1 mM IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid) induziert. Nach 4-5 h Induktion wurden die Zellen 20 min bei 10000 g und 4 °C sedimentiert und in 5 ml denaturierendem Lysepuffer (8 M Harnstoff, 100 mM  $Na_2HPO_4$ , 10 mM Tris-HCl pH 8,0) resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte durch fünfminütige Ultraschallbehandlung auf Eis mit einem Ultraschallgerät mit Mikrospritze (Branson Ultrasonic, USA). Die Zellmembran und andere unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation für 20 min bei 12000 g und 4 °C von den löslichen Proteinen getrennt. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde zu 1/5 Volumen Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni-NTA) bzw. Zink-Nitrilotriessigsäure-Agarose (Zn-NTA) gegeben und 20 min schüttelnd im „batch-Verfahren“ bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Suspension kurz abzentrifugiert, der Überstand entfernt und das Sediment mit der Ni-NTA-Agarose und dem gebundenen Gvp-His-Protein 4 mal mit 5-fachem Volumen Waschlösung (8 M Harnstoff, 300 mM NaCl, 10% Glycerin, 100 mM  $Na_2HPO_4$ , 10 mM Tris-HCl pH 6,0) von unspezifisch an die Ni-NTA-Agarose gebundenen Proteinen befreit. Die Elution der His-tag-Fusionsproteine erfolgte durch Zugabe von einem Matrixvolumen Elutionspuffer (8 M Harnstoff, 100 mM  $Na_2HPO_4$ , 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM Imidazol). Da nach der ersten Elution immer noch große Mengen von Gvp-His-Proteinen an der Matrix hafteten, wurde ein zweiter Elutionsschritt angehängt. Die Eluate wurden mit 12-16%igen Tricin-SDS-Polyacrylamidgelen analysiert.

Bei ungenügendem Reinigungserfolg (Elutionen zu unrein) wurde die Elutionsfraktion gegen Lysepuffer dialysiert, um das Imidazol zu entfernen, und die Elutionsfraktion wurde für ein zweites Reinigungsverfahren mit einer Zn-NTA-Matrix versetzt. Die zweite Reinigung mit Hilfe der Zn-NTA-Agarose erfolgte nach dem gleichen Schema wie die Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose, der pH-Wert des Waschlösung betrug jedoch pH 8,0.

Für in *vitro*-Untersuchungen mit den gereinigten Proteinen wurden diese rückgefaltet durch schrittweise Dialyse gegen Puffer mit 10 mM Tris-HCl pH 7,2, abnehmender Harnstoffkonzentration und steigender KCl-Konzentration (Puffer A: 4 M Harnstoff, 0,8 M KCl; Puffer B: 2 M Harnstoff, 1,6 M KCl; Puffer C: 2,5 M KCl). Für die Produktion von Antisera wurden die gereinigten Proteine dialysiert gegen 100 mM  $Na_2HPO_4$  pH 8,0 (GvpD, GvpE) bzw. gegen 10 mM Tris-HCl pH 7,2, 2,5 M KCl (GvpF).

## **Herstellung von Metall<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Matrices für die Reinigung von Gvp-His-Proteinen**

Für die Herstellung verschiedener Metall<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Matrices für die Reinigung von Gvp-His-Proteinen wurde die Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni-NTA-Agarose, Qiagen) 4 mal mit 3-fachem Volumen 250 mM EDTA, pH 8,0 gewaschen, um Ni<sup>2+</sup>-Ionen aus dem Ni-NTA-Komplex zu entfernen. EDTA wurde durch zweimaliges Waschen der metallfreien NTA-Agarose mit 5-fachem Volumen deionisiertem H<sub>2</sub>O entfernt. Die metallfreie NTA-Agarose wurde anschließend wieder mit Metallionen beladen, indem die Matrix zweimal mit 3-fachem Volumen 100 mM CoSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub> oder ZnSO<sub>4</sub> inkubiert wurde. Die Metall<sup>2+</sup>-NTA-Agarose wurde von überschüssigen Metallionen durch zweimaliges Waschen mit deionisiertem Wasser befreit und anschließend mit einem geeigneten Puffer für die Reinigung von Gvp-His-Proteinen äquilibriert.

## **Affinitätschromatographie mit gebundenen Gvp-His-Proteinen für den Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen**

Die gereinigten Gvp-His-Proteine wurden wie vorhergehend beschrieben in 2,5 M KCl rückgefaltet und anschließend an Ni-NTA-Agarose gebunden, die vorher mit 2,5 M KCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,2 äquilibriert wurde. Für die Herstellung der Affinitätschromatographiematrix wurden ungefähr 400 µg Gvp-His mit 100 µl Ni-NTA-Agarose für 1 h über-Kopf-schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wurde kurz abzentrifugiert, der Überstand entfernt und das Sediment mit der Ni-NTA-Agarose und dem gebundenen Gvp-His-Protein durch 2-maliges Waschen mit 5-fachem Volumen 2,5 M KCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,2 von nicht gebundenen Proteinen befreit. Anschließend wurden 4 mg der löslichen Fraktion des Gesamtproteingehalts einer in 25% Salz angezogenen, stationär gewachsenen Kultur von *Hf. mediterranei* mit 100 µl der Gvp-His-Ni-NTA-Matrix für 30 min schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wurde kurz abzentrifugiert, der Überstand entfernt und das Sediment mit der Gvp-His-Ni-NTA-Agarose und evtl. gebundenen Proteinen aus *Hf. mediterranei* 4 mal mit 5-fachem Volumen 2,5 M KCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,2 von unspezifisch an die Matrix gebundenen Proteinen befreit.

Proteine von *Hf. mediterranei*, die mit dem Matrix-Gvp-His-Protein interagieren konnten, wurden durch drei aufeinanderfolgende Elutionsschritte von der Matrix eluiert. Elutionspuffer 1 (2,5 M KCl, 10 mM Tris-NaOH pH 11) und Elutionspuffer 2 (10 mM Tris-HCl pH 7,2) wurden benutzt, um mögliche Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen halophilen Proteinen auf der Matrix aufzulösen und den Proteinpartner ohne His-tag zu eluieren.

ren. Mit Hilfe des Elutionspuffers 3 (500 mM Imidazol, 10 mM Tris-HCl pH 7,2) wurden die Gvp-His-Proteine mit allen möglicherweise assoziierten Proteinen eluiert. Die Elution erfolgte jeweils durch Zugabe von einem Matrixvolumen des entsprechenden Elutionspuffers. Die Proteine in den Eluaten wurden mit Hilfe elektrophoretischer Auftrennung in 12%igen Tricin-SDS-Polyacrylamidgelen und Western-Analysen mit Hilfe von Antiseren gegen Gas-vesikelproteine analysiert.

### **Affinitätschromatographie mit gebundenen Gvp-His-Proteinen für den Nachweis von ATP-/GTP-Bindefunktionen**

Die Herstellung von Ni-NTA-Agarose-Matrices mit gebundenen Gvp-His-Proteinen erfolgte wie vorhergehend beschrieben. Für die Bindung von ATP oder GTP an die Matrixgekoppelten Proteine wurde 1 ml einer Lösung mit 200 nmol ATP bzw. GTP (0,2 mM ATP/GTP, 2,5 M KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl pH 7,2) mit 100 µl der Gvp-His-Ni-NTA-Matrix für 1 h schüttelnd bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Suspension wurde kurz abzentrifugiert, der Überstand entfernt und das Sediment mit der Gvp-His-Ni-NTA-Agarose und evtl. gebundenen ATP/GTP 4 mal mit 5-fachem Volumen 2,5 M KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl pH 7,2 von nicht gebundenem ATP/GTP befreit. Putativ an Matrix-Gvp-His-Proteine gebundene ATP/GTP-Moleküle wurden durch zwei aufeinanderfolgende Elutionsschritte von der Matrix eluiert. Elutionspuffer 1 (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM KCl, 20 mM Tris-NaOH pH 11) wurde benutzt, um mögliche ATP-/GTP-Bindungen mit dem Matrixgebundenen Gvp-His zu lösen und ATP/GTP zu eluieren, während das Gvp-His-Protein an der Matrix gebunden bleibt. Mit Hilfe des Elutionspuffers 2 (500 mM Imidazol, 10 mM Tris-HCl pH 7,2) wurden die Gvp-His-Proteine zusammen mit möglicherweise gebundenem ATP/GTP eluiert. Die Elution erfolgte jeweils durch Zugabe von zwei Matrixvolumen des entsprechenden Elutionspuffers. Die Eluate wurden auf ein Volumen von 20 µl eingengt und mittels hochauflösender Dünnschichtchromatographie analysiert.

### **Hochauflösende Dünnschichtchromatographie (*High Performance Thin Layer Chromatography*, HPTLC)**

Der Nachweis der Nukleosidtriphosphate ATP und GTP sowie der Nukleosiddiphosphate ADP und GDP erfolgte mittels Hochauflösender Dünnschichtchromatographie (modifiziert nach Cooper & Trüper, 1979). Dazu wurden je 20 µl in 1 µl-Aliquots sukzessive auf eine Dünnschichtchromatographieplatte (Silica gel 60 F254, Merck, Darmstadt) aufgetragen und mit einem Fön getrocknet. Die Platten wurden mit einem Gemisch aus Isopropanol, Ammoni-

ak und Wasser im Verhältnis 3:1:1 (modifiziert nach Kelly & Wood, 1994) entwickelt und vorhandene Nukleosidphosphate wurden durch Bestrahlen mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm sichtbar gemacht. Als Referenzen dienten die entsprechenden Reinsubstanzen ATP, ADP, GTP und GDP. Da das in den Proben vorhandene und aufkonzentrierte Salz die Laufeigenschaften der Nukleosidphosphate veränderte, wurden die Referenzsubstanzen in identischem Puffer auf die Dünnschichtchromatographieplatten aufgetragen. Damit die Pufferzusammensetzung der Referenzsubstanzen identisch mit den Eluaten aus den Affinitätschromatographie-Experimenten war, wurden bei den Affinitätschromatographie-Experimenten parallel Kontrollen gemacht, die nicht mit ATP/GTP inkubiert, sonst aber identisch behandelt wurden. Die ATP-/GTP-freien Kontrolleluate wurden anschließend mit 5 pmol der Referenzsubstanzen versetzt und als Vergleich auf einer Dünnschichtchromatographieplatte aufgetrennt.

### **β-Galaktosidase-Test (ONPG-Test)**

Die β-Galaktosidase-Aktivität in *Hf. volcanii*-Transformanten wurde mit dem ONPG (ortho-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid)-Test entsprechend dem Protokoll von Holmes *et al.* (1997) ermittelt. Für den Testassay wurden je 100 µl Kultur entnommen (bzw. 1000 µl bei frühen exponentiellen Kulturen, wodurch ein Abzentrifugieren der Zellen für 2 min bei 13000 rpm und die Aufnahme in 100 µl des entsprechenden Mediums nötig war). Anschließend wurden die resuspendierten Zellen mit 800 µl ONPG-Testpuffer (2,5 M NaCl, 10 µM MnCl<sub>2</sub>, 0,1% β-Mercaptoethanol, 50 mM Tris-HCl pH 7,2) und zur Lyse der Zellen mit 50 µl 2% Triton X-100 versetzt und 5 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Die β-Galaktosidaseaktivität in den Transformanten wurde bei 20 °C durch Zugabe von 50 µl ONPG-Lösung (8 mg/ml ONPG in 0,1 M Tris-HCl pH 7,2) als Absorptionsänderung pro Zeiteinheit photometrisch bei 405 nm verfolgt.

Der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  für das Produkt o-Nitrophenol aus der β-glykosidischen Spaltung von ONPG beträgt bei 405 nm  $3,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Eine Einheit (Unit) der β-Galaktosidaseaktivität ist definiert als die Enzymmenge, die die Hydrolyse von 1 µmol ONPG pro min katalysiert. Die spezifische β-Galaktosidaseaktivität ist definiert als Quotient aus den Units der β-Galaktosidaseaktivität pro mg Gesamtprotein.

# Ergebnisse

In dem moderat halophilen Archaeon *Hf. mediterranei* ist die Gasvesikelbildung in Abhängigkeit von der Wachstumsphase und von der Salzkonzentration im Medium reguliert. Die Transkription der mc-vac-Region ist abhängig von zwei Promotoren, die sich vor den Genen mc-gvpA (mcA-Promotor) und mc-gvpD (mcD-Promotor) befinden und die Genprodukte von mc-gvpD und mc-gvpE sind an deren Regulation beteiligt. Die Bezeichnung „mc“ definiert die gvp-Gene von *Hf. mediterranei*, welche chromosomal kodiert sind, und unterscheidet diese von den plasmidkodierten p-gvp-Genen und chromosomal kodierten c-gvp-Genen von *Hb. salinarum*. Da sich die vorliegende Arbeit hauptsächlich mit Genen und Genprodukten der mc-vac-Region beschäftigt, habe ich zur Vereinfachung den Zusatz „mc“ weggelassen und diesen nur im Vergleich mit Genen und Genprodukten der p-vac- und c-vac-Region zugefügt. In dieser Arbeit sollte vor allem die wachstumsphasenabhängige Regulation der Gasvesikelbildung durch die regulatorischen Proteine GvpD und GvpE näher charakterisiert sowie der Frage nachgegangen werden, ob und welche weiteren Gene ebenfalls an der Regulation der mc-vac-Region beteiligt sind. Für die Untersuchung der Regulation des mcA-Promotors durch Proteine der mc-vac-Region wurden Transformanten von *Hf. volcanii* verwendet, welche die mc-vac-Region bzw. Teile dieser Genregion enthielten.

## 1. Wachstumsphasenabhängige Regulation der Gasvesikelbildung

### 1.1. Anpassung von Medien für *Hf. volcanii* und *Hf. mediterranei*

Für die Untersuchung der Regulation der mc-vac-Promotoren mit Hilfe von Transformanten von *Hf. volcanii* wurden bestehende Medien weiterentwickelt, in denen sowohl *Hf. volcanii* als auch *Hf. mediterranei* optimal kultiviert werden konnten. Sowohl *Hf. mediterranei* als auch Transformanten von *Hf. volcanii*, die die mc-vac-Region enthielten, sollten hier die typische wachstumsphasenabhängige Regulation der Gasvesikelbildung zeigen und somit nur in der stationären Wachstumsphase Gasvesikel bilden. Diese Medien sollten identisch für die Kultivierung von *Hf. mediterranei* und *Hf. volcanii* sein, um eine hohe Vergleichbarkeit der Wachstumsbedingungen zu erreichen. In früheren Arbeiten wurden aus dem gleichen Grund bereits Medien für *Hf. volcanii* auf der Basis der *Hf. mediterranei*-Medien (Rodriguez-Valera *et al.*, 1983) mit verschiedenen Salzkonzentrationen entwickelt (Röder, 1997). Da diese Me-

dien z. T. zu Problemen beim Wachstum von *Hf. volcanii*-Transformanten führten, wurden im Rahmen dieser Arbeit Medien auf der Basis des *Hf. volcanii*-Mediums (Mullakhanbhai & Larsen, 1975) für *Hf. volcanii* und *Hf. mediterranei* entwickelt. Ein Vergleich dieser Medien mit den bereits publizierten Medien ist in Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 3.** In dieser Arbeit modifizierte Halobakterien-Medien

Medium	c(NaCl)	c(MgSO <sub>4</sub> )	c(KCl)	Nährstoff-Quelle
15%- <i>Hf. mediterranei</i> -Medium (Rodriguez-Valera <i>et al.</i> , 1983)	2,3 M	60 mM	20 mM	1,5% Pepton
25%- <i>Hf. mediterranei</i> -Medium (Rodriguez-Valera <i>et al.</i> , 1983)	4,0 M	60 mM	20 mM	1,5% Pepton
21%- <i>Hf. volcanii</i> -Vollmedium (Mullakhanbhai & Larson, 1975)	3,0 M	150 mM	50 mM	0,5% Trypton 0,3% Hefeextrakt
15%- <i>Hf. volcanii</i> -Medium (Röder, 1997)	1,9 M	150 mM	40 mM	1,5% Pepton
25%- <i>Hf. volcanii</i> -Medium (Röder, 1997)	3,4 M	150 mM	40 mM	1,5% Pepton
<b>15%-<i>Hf. volcanii</i>-Medium (diese Arbeit)</b>	1,9 M	150 mM	50 mM	0,5% Trypton 0,3% Hefeextrakt
<b>25%-<i>Hf. volcanii</i>-Medium (diese Arbeit)</b>	3,6 M	150 mM	50 mM	0,5 % Trypton 0,3% Hefeextrakt

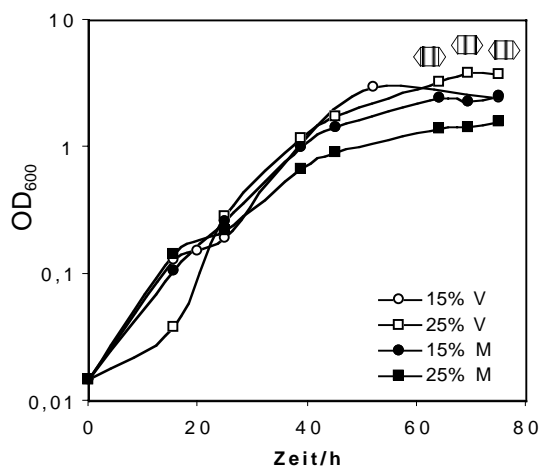
Bei der Entwicklung dieser Medien musste sichergestellt werden, dass weder das Wachstum noch die Gasvesikelbildung von *Hf. mediterranei* beeinträchtigt oder verändert war. Dazu wurden Kulturen von *Hf. mediterranei* sowohl in den modifizierten *Hf. volcanii*-Medien als auch in den für *Hf. mediterranei* publizierten Medien mit 15% und 25% Salz angeimpft und bezüglich des Wachstums der Zellen, der Gasvesikelbildung und der Transkription der mc-vac-Region miteinander verglichen.

Das Wachstum von *Hf. mediterranei* in den hier verwendeten modifizierten *Hf. volcanii*-Medien war optimal und zeigte keinerlei Einschränkungen gegenüber dem *Hf. mediterranei*-Medium (Tabelle 4; Abb. 4). Die Wachstumsratenkonstanten von *Hf. mediterranei* waren in den *Hf. volcanii*-Medien sogar größer als diejenigen in den *Hf. mediterranei*-Medien (Tabelle 4). Die Verdopplungszeiten waren entsprechend kürzer. Während des Wachstums der Zellen in den verschiedenen Medien wurde in regelmäßigen Abständen die Gasvesikelbildung verfolgt. Da Gasvesikel stark lichtbrechende Eigenschaften besitzen, konnten Aggregate von Gasvesikeln als helle Bereiche innerhalb der Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop nachgewiesen werden.

**Tabelle 4.** Wachstum von *Hf. mediterranei* in verschiedenen Medien

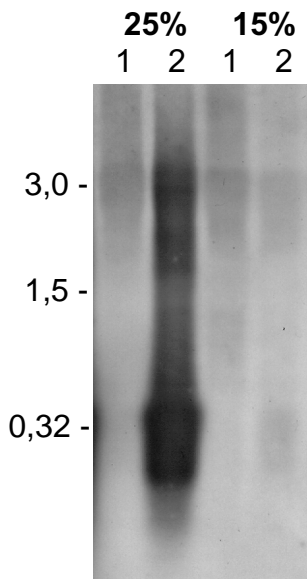
Medium	Verdopplungszeit ( $t_D$ )	Wachstumsratenkonstante $\mu$ ( $\ln 2/t_D$ )
15%- <i>Hf. mediterranei</i> -Medium	6,3 h	0,11 h <sup>-1</sup>
25%- <i>Hf. mediterranei</i> -Medium	7,1 h	0,09 h <sup>-1</sup>
15%- <i>Hf. volcanii</i> -Medium	4,1 h	0,17 h <sup>-1</sup>
25%- <i>Hf. volcanii</i> -Medium	4,8 h	0,14 h <sup>-1</sup>

In den Medien mit 15% Salz war keine Gasvesikelbildung zu beobachten. In den Medien mit 25% Salz waren sowohl mit dem „Mediterranei“-Medium als auch mit dem „Volcanii“-Medium ab dem Zeitpunkt 64 h, also dem Eintritt der Kulturen in die stationäre Wachstumsphase, Gasvesikel zu sehen.



**Abb. 4.** Wachstum von *Hf. mediterranei* in 15 und 25% „Volcanii“-Medium (15% V, 25% V) und 15 und 25% „Mediterranei“-Medium (15% M, 25% M). Die Zusammensetzung der Medien ist in Tabelle 3 angegeben. Die Zeitpunkte, bei denen eine Gasvesikelbildung unter dem Lichtmikroskop beobachtbar war, sind mit schematischen Gasvesikeln gekennzeichnet.

Die Northern-Analyse der *gvpA*-mRNA-Bildung der *Hf. mediterranei*-Kulturen in den „Volcanii“-Medien war in Übereinstimmung mit der Gasvesikelbildung (Abb. 5). Mit der in 15% Salz angezogenen Kultur konnte exponentiell keine *gvpA*-mRNA und stationär nur in sehr geringem Maße das 0,32 kb große *gvpA*-Transkript nachgewiesen werden (Abb. 5). Mit der in 25% Salz angezogenen Kultur konnten nur in der stationären Wachstumsphase die *gvpA*-mRNA-Transkripte der Größen 0,32 kb, 1,8 kb, 2,4 kb und 3,0 kb nachgewiesen werden. Aufgrund des unveränderten Verhaltens von *Hf. mediterranei* in den für *Hf. volcanii* optimierten Medien waren die Voraussetzungen geschaffen, mit Hilfe von *Hf. volcanii*-Transformanten die wachstumsphasenabhängige Regulation der Expression der *mc-vac*-Region unter den gleichen Wachstumsbedingungen zu studieren, wie sie auch in *Hf. mediterranei* beobachtet werden kann.



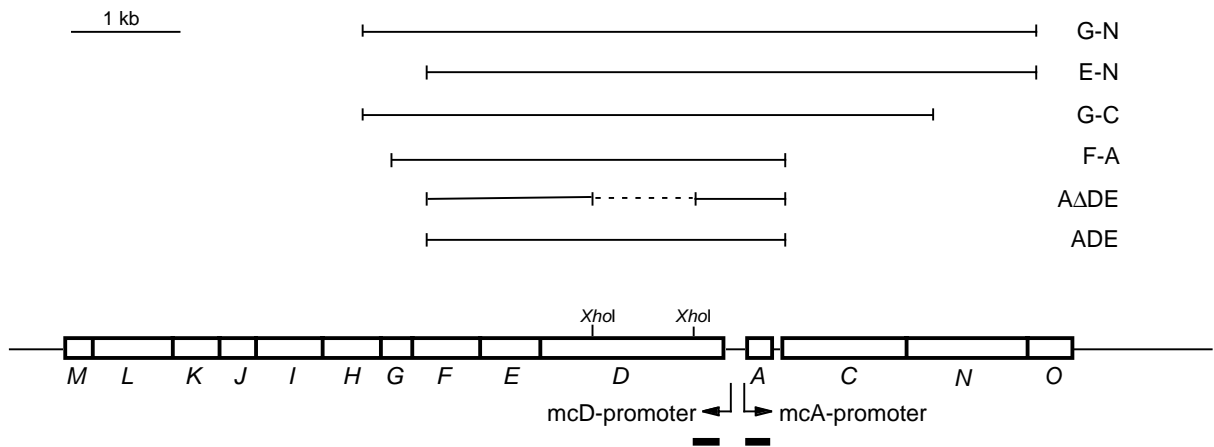
**Abb. 5.** Northern-Analyse der *gvpA*-mRNA-Bildung von *Hf. mediterranei* in 15 und 25% „Volcanii“-Medium mit der *gvpA*-Sonde (A-Sonde, Abb. 6). In jeder Spur wurden 5 µg Gesamt-RNA aufgetragen. Die Proben stammten aus der exponentiellen (1) und der stationären Wachstumsphase (2). Die Längen (in kb) des RNA-Größenstandards sind links angegeben.

### 1.2. Untersuchung der Regulation des *gvpA*-Promotors mittels Northern-Analysen von *Hf. volcanii*-Transformanten

Aus früheren Untersuchungen war bereits bekannt, dass das *gvpE*-Genprodukt die Transkription am *gvpA*-Promotor (mcA-Promotor) sowie am *gvpD*-Promotor (mcD-Promotor) aktiviert und für die Aktivierung sonst keine weiteren Faktoren nötig sind (Röder & Pfeifer, 1996; Gregor & Pfeifer, 2001). Im Gegensatz zu GvpE ist das Genprodukt von *gvpD* an der Repression der Gasvesikelbildung beteiligt (Englert *et al.*, 1992b). Da Transformanten von *Hf. volcanii* mit *gvpADE* nicht in der Lage waren, die *gvpA*-mRNA-Bildung in der exponentiellen Wachstumsphase zu reprimieren, wurde postuliert, dass weitere Faktoren für die Regulation des mcA-Promotors existieren müssen (Röder, 1997). Mit verschiedenen Transformanten von *Hf. volcanii*, die unterschiedliche *gvp*-Gene enthielten, konnte der regulatorisch wichtige Bereich für die Repression der *gvpA*-mRNA-Bildung während der exponentiellen Wachstumsphase auf den Bereich von *gvpDEFG-gvpACN* (G-N-Konstrukt) reduziert werden (Röder, 1997). Allerdings blieb unklar, welche Proteine aus dem G-N-Bereich tatsächlich an der Repression der *gvpA*-mRNA-Bildung in der exponentiellen Wachstumsphase beteiligt sind.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden weitere Northern-Analysen mit Transformanten von *Hf. volcanii* durchgeführt, die Konstrukte mit unterschiedlichen Sätzen von *gvp*-Genen aus dem G-N-Bereich enthielten (Abb. 6). Bei der Auswahl der herzustellenden *gvp*-Genkonstrukte sollten bestimmte Kandidatengene zusätzlich zu *gvpADE* sowohl in *cis* als auch in *trans* zugegeben werden.





**Abb. 6.** Genetische Karte der *mc-vac*-Region von *Hf. mediterranei* und schematische Darstellung von Konstrukten, die für die Transformation von *Hf. volcanii* verwendet wurden. Die *mc-gvp*-Gene sind jeweils als Kästen dargestellt und mit Großbuchstaben bezeichnet. Die Schnittstellen für das Restriktionsenzym *XhoI* sind markiert. Die Balken unter *gvpA* und dem 5'-Bereich von *gvpD* repräsentieren die RNA-Sonden, die für die Northern-Analysen verwendet wurden (A-Sonde und 5'-D-Sonde). Die Linien oberhalb der Genkarte repräsentieren Konstrukte für die Transformation von *Hf. volcanii*, wobei die gestrichelte Linie den deletierten Bereich markiert.

### 1.2.1. Regulation des *mcA*-Promotors durch GvpD und GvpE

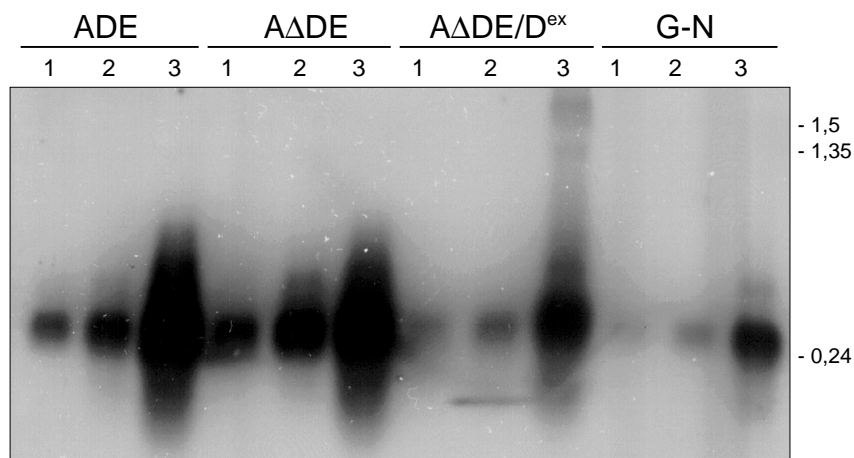
Für die Klärung der Frage, inwiefern die beiden Regulatoren GvpD und GvpE eine Regulation der *gvpA*-mRNA-Bildung bewirken, wurden zunächst Kontrollversuche mit *Hf. volcanii*-Transformanten durchgeführt, die das ADE-Konstrukt bzw. das AΔDE-Konstrukt enthielten. Transformanten mit den gleichen Konstrukten wurden bereits von Richard Röder (Röder & Pfeifer, 1996) untersucht, wurden aber hier nochmals als Kontrolle mit analysiert. Ebenso wurden Transformanten mit dem G-N-Konstrukt als Kontrollen getestet, die die Gene *gvpDEFG* und *gvpACN* enthielten.

In der früh- und spät-exponentiellen Wachstumsphase waren bei den G-N-Transformanten nur sehr geringe Mengen *gvpA*-mRNA nachweisbar (Abb. 7). Erst in der stationären Wachstumsphase hybridisierten größere Mengen *gvpA*-mRNA, was der Regulation der *gvpA*-mRNA-Bildung im Wildtyp *Hf. mediterranei* entspricht.

Die ADE-Transformanten enthielten relativ große Mengen *gvpA*-mRNA vor allem in der stationären Wachstumsphase (Abb. 7). Obwohl jeweils gleiche Mengen an Gesamt-RNA aus der früh-exponentiellen, der spät-exponentiellen und der stationären Wachstumsphase miteinander verglichen wurden, hybridisierten hier deutlich unterschiedliche Mengen an *gvpA*-mRNA während der früh-exponentiellen bis zur stationären Wachstumsphase (Abb. 7). Im Vergleich mit den G-N-Transformanten hybridisierten hier jedoch jeweils deutlich größere Mengen *gvpA*-mRNA.

Die Transformanten mit dem A $\Delta$ DE-Konstrukt zeigten ähnliche *gvpA*-mRNA-Mengen wie die ADE-Transformanten. Die *gvpA*-mRNA-Menge war hier in der exponentiellen Phase allerdings geringfügig größer als in der ADE-Transformante. Diese Vorversuche waren in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Röder & Pfeifer (1996) bzw. Röder (1997).

Mit dem A $\Delta$ DE/D<sup>ex</sup>-Konstrukt wurde eine weitere Transformante getestet, die zusätzlich zu A $\Delta$ DE auf einem zweiten Plasmid *gvpD* in dem halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35 unter der Kontrolle des starken Ferredoxin-Promotors (*fdx*-Promotor) enthielt. Diese unterschied sich von den von Röder & Pfeifer (1996) untersuchten Transformanten in der Weise, dass das *fdx*-Promotor-*gvpD*-Fusionskonstrukt für eine frühe Bildung großer Mengen von GvpD sorgte. Die Expression von *gvpD* unterschied sich des weiteren dadurch, dass die 82 Nukleotide lange Genregion, die für den mRNA-*leader* von *gvpD* kodiert, in dem D<sup>ex</sup>-Konstrukt fehlte und das GvpD-Protein am N-Terminus zusätzlich die beiden Aminosäuren Methionin und Prolin besaß.



**Abb. 7.** Northern-Analyse zum Nachweis der *gvpA*-Transkripte in den ADE-, A $\Delta$ DE-, A $\Delta$ DE/D<sup>ex</sup>-, und G-N-Transformanten. In jeder Spur wurden 5  $\mu$ g Gesamt-RNA aus den jeweiligen *Hf. volcanii*-Transformanten aufgetragen, die (1) aus der frühen exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600} = 0,2-0,3$ ), (2) aus der späten exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600} = 0,45-0,6$ ) bzw. (3) aus der stationären Wachstumsphase ( $OD_{600} > 2$ ) isoliert wurden. Die RNA wurde mittels eines 1,2%igen Formaldehyd-enthaltenden Agarosegels aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit der mc-*gvpA*-spezifischen RNA-Sonde (A-Sonde, Abb. 6) hybridisiert. Die Längen (in kb) des RNA-Größenstandards sind rechts angegeben.

Transformanten mit A $\Delta$ DE/D<sup>ex</sup> zeigten ähnlich den G-N-Transformanten nur sehr geringe Mengen *gvpA*-mRNA in der früh- und spät-exponentiellen Wachstumsphase und auch geringere *gvpA*-mRNA-Mengen in der stationären Wachstumsphase (Abb. 7). Die hier erzielte vollständige Regulation des *gvpA*-Promotors in der Weise, dass *gvpA*-mRNA erst in der stationären, nicht aber in der exponentiellen Phase in größeren Mengen nachweisbar war, wurde in diesem Versuch mit Hilfe des *fdx*-Promotor-*gvpD*-Fusionskonstrukts durch die frühe Bil-

dung großer Mengen GvpD erreicht. Die Expression von *gvpD* in dem ADE-Konstrukt mit dem nativen *mcD*-Promotor zeigte diese Regulation nicht, bzw. nur sehr schwach.

Die Ergebnisse zeigten, dass im ADE-Konstrukt noch keine vollständige Regulation erreicht, dies aber durch Zugabe weiterer Gene im G-N-Konstrukt oder durch die frühe und starke Expression von *gvpD* bewirkt werden konnte. Für die Analyse weiterer, an der Regulation des *gvpA*-Promotors beteiligter Gene könnte dies bedeuten, dass diese Gene die zeitliche Expression von *gvpD* oder die Menge von GvpD beeinflussen könnten. Eine zweite Erklärung wäre, dass die entsprechenden Genprodukte nur im Zusammenspiel mit GvpD die vollständige Regulation am *gvpA*-Promotor bewirken könnten. Ziel der weiteren Arbeit war daher, zum einen die Gene zu identifizieren, die mit oder ohne *gvpD* an der Regulation des *gvpA*-Promotors beteiligt sind und zum anderen deren Funktion zu analysieren.

### **1.2.2. Einfluß von GvpF, GvpG und GvpN in Verbindung mit GvpD und GvpE auf die Regulation des *mcA*- und des *mcD*-Promotors**

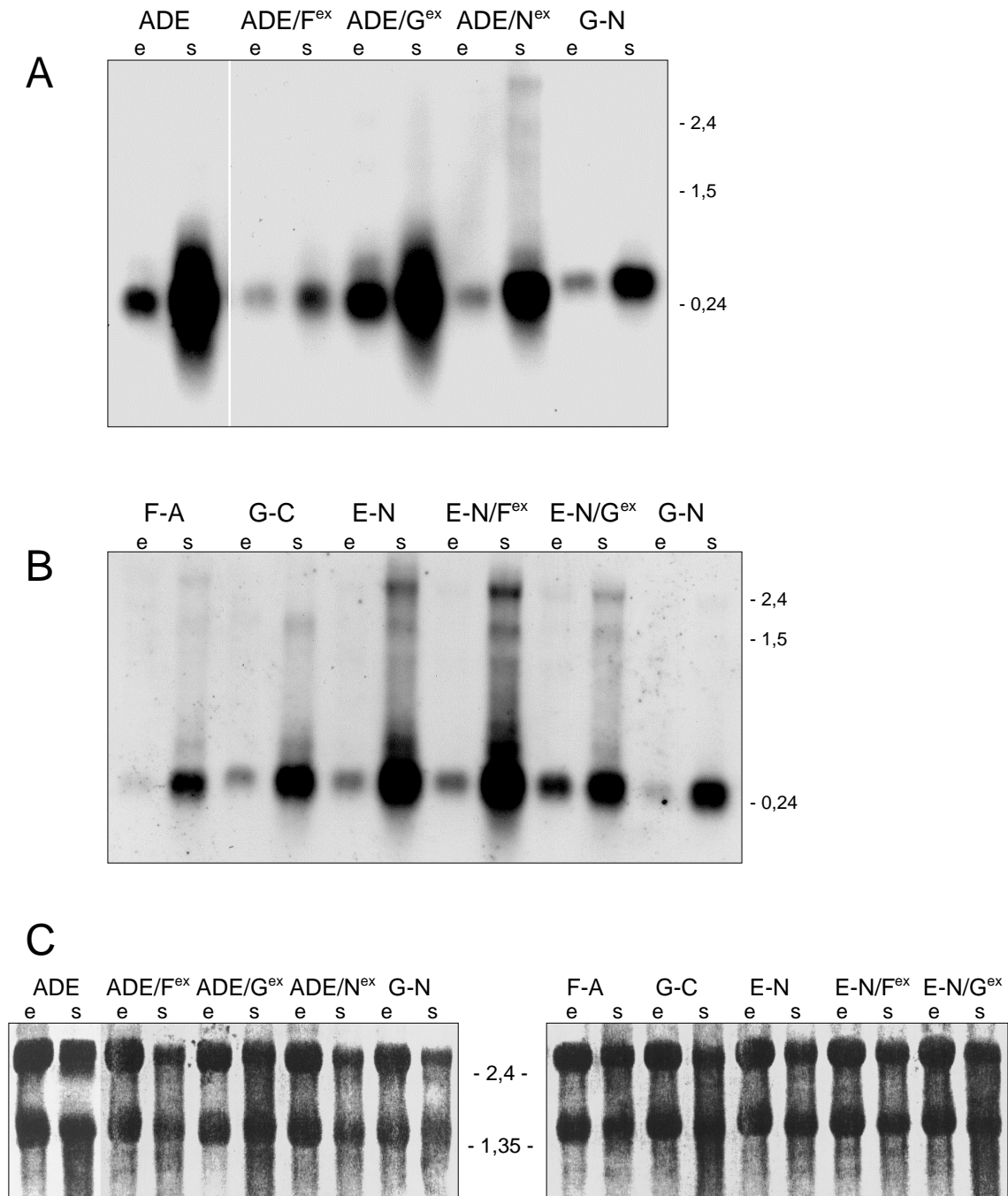
#### Einfluß auf den *mcA*-Promotor

Um der Frage näherzukommen, welche weiteren Gene benötigt werden, um die vollständige Regulation des *gvpA*-Promotors in der Weise zu erreichen, dass *gvpA*-mRNA erst in der stationären nicht aber in der exponentiellen Phase in größeren Mengen nachweisbar ist, wurden Northern-Analysen mit Transformanten durchgeführt, die Teile aus dem G-N-Bereich (*gvpDEFG-gvpACN*) enthielten (Abb. 6). Dabei wurden die zusätzlich im G-N-Konstrukt vorhandenen Gene *gvpF*, *gvpG* und *gvpN* zum einen in *cis* in Konstrukten exprimiert, was über eine Verlängerung des ADE-Konstrukts bzw. eine Verkürzung des G-N-Konstrukts erreicht wurde. Zum anderen wurden Transformanten hergestellt, bei denen *gvpF*, *gvpG* und *gvpN* in *trans* in pJAS35 exprimiert wurden. Die Transformanten von *Hf. volcanii*, die sowohl das ADE-Konstrukt als auch *gvpF*, *gvpG* oder *gvpN* in pJAS35 enthielten, wurden anschließend auf mRNA-Ebene untersucht.

Die ADE/F<sup>ex</sup>-Transformante zeigte im Vergleich mit der ADE-Transformante eine deutlich geringere *gvpA*-mRNA-Bildung sowohl während der exponentiellen als auch während der stationären Wachstumsphase (Abb. 8A) und ähnelte damit der G-N-Transformante, die die vollständige Regulation zeigt.

Die ADE/N<sup>ex</sup>-Transformante bildete in der exponentiellen Wachstumsphase ebenfalls geringere mRNA-Mengen als die ADE-Transformante. In der stationären Wachstumsphase war der Unterschied in den *gvpA*-mRNA-Mengen allerdings nicht so groß wie bei der ADE/F<sup>ex</sup>-Transformante (Abb. 8A).

Bei der ADE/ $G^{ex}$ -Transformante hybridisierten hingegen ähnlich hohe *gvpA*-mRNA-Mengen wie bei der ADE-Transformante.



**Abb. 8.** Northern-Analyse zum Nachweis der *gvpA*-Transkripte in den *Hf. volcanii*-Transformanten.

**A.** Transformanten mit ADE, ADE/ $F^{ex}$ , ADE/ $G^{ex}$ , ADE/ $N^{ex}$  und G-N. **B.** Transformanten mit F-A, G-C, E-N, E-N/ $F^{ex}$ , E-N/ $G^{ex}$  und G-N. In jeder Spur wurden 5  $\mu$ g Gesamt-RNA, die (e) aus der exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600} = 0,2-0,3$ ), und (s) aus der stationären Wachstumsphase ( $OD_{600} > 2$ ) isoliert wurden. Die RNA wurde mittels 1,2%igen Formaldehyd-enthaltenden Agarosegelen aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit der *mc-gvpA*-spezifischen RNA-Sonde (A-Sonde, Abb. 6) hybridisiert. Die Längen (in kb) des RNA-Größenstandards sind rechts angegeben. **C.** Kontrolle von Quantität und Qualität der untersuchten Gesamt-RNA anhand der Schärfe der Banden der 23S rRNA und der 16S rRNA durch Anfärben der transferierten Gesamt-RNA mit Methylenblau.

Die Transformanten von *Hf. volcanii* mit den Konstrukten F-A, G-C bzw. E-N (Abb. 6) produzierten alle geringere *gvpA*-mRNA-Mengen in der exponentiellen Wachstumsphase als die ADE-Transformante (Abb. 8B). Dabei zeigte die Transformante mit dem F-A-Konstrukt, das zusätzlich zu *gvpADE* nur noch *gvpF* enthielt, die geringste *gvpA*-mRNA-Menge in der exponentiellen Wachstumsphase und entsprach dem Expressionsmuster der G-N-Transformante mit der vollständigen Regulation des *gvpA*-Promotors. Mit zwei weiteren *Hf. volcanii*-Transformanten wurde die zusätzliche Expression von *gvpF* bzw. *gvpG* zu dem E-N-Konstrukt (Abb. 6) getestet. Bei der E-N/F<sup>ex</sup>-Transformante war allerdings kein Unterschied zur E-N-Transformante zu erkennen (Abb. 8B). Die zusätzliche Anwesenheit von GvpF bewirkte in dieser Transformante keine weitere Reduktion der *gvpA*-mRNA-Menge. Allerdings war die *gvpA*-mRNA-Menge bereits in der E-N-Transformante ähnlich reduziert wie in der G-N-Transformante. Die E-N/G<sup>ex</sup>-Transformante enthielt sowohl in der exponentiellen als auch in der stationären Wachstumsphase große Mengen an *gvpA*-mRNA, was auf keine Repression des *gvpA*-Promotors hindeutete. Die *gvpA*-mRNA-Menge war im Gegenteil in der exponentiellen Wachstumsphase erhöht, wenn man die beiden Transformanten E-N und E-N/G<sup>ex</sup> miteinander vergleicht.

#### Einfluß auf den mcD-Promotor

Die Bildung der Regulatoren GvpD und GvpE und auch die Expression des möglicherweise ebenfalls an der Regulation beteiligten *gvpF* ist abhängig von der Aktivität des mcD-Promotors. Da die Aktivität des mcD-Promotors somit wichtig für die Bildung von Proteinen ist, die den mcA-Promotor regulieren, ist auch die Regulation des mcD-Promotors wichtig für die Modulierung der Aktivität des mcA-Promotors. In den folgenden Northern-Analysen wurde daher auch die Aktivität des mcD-Promotors in den oben dargestellten *Hf. volcanii*-Transformanten untersucht. Als Sonde für die Northern-Analysen diente die 5′-*gvpD*-RNA-Sonde (Abb. 6).

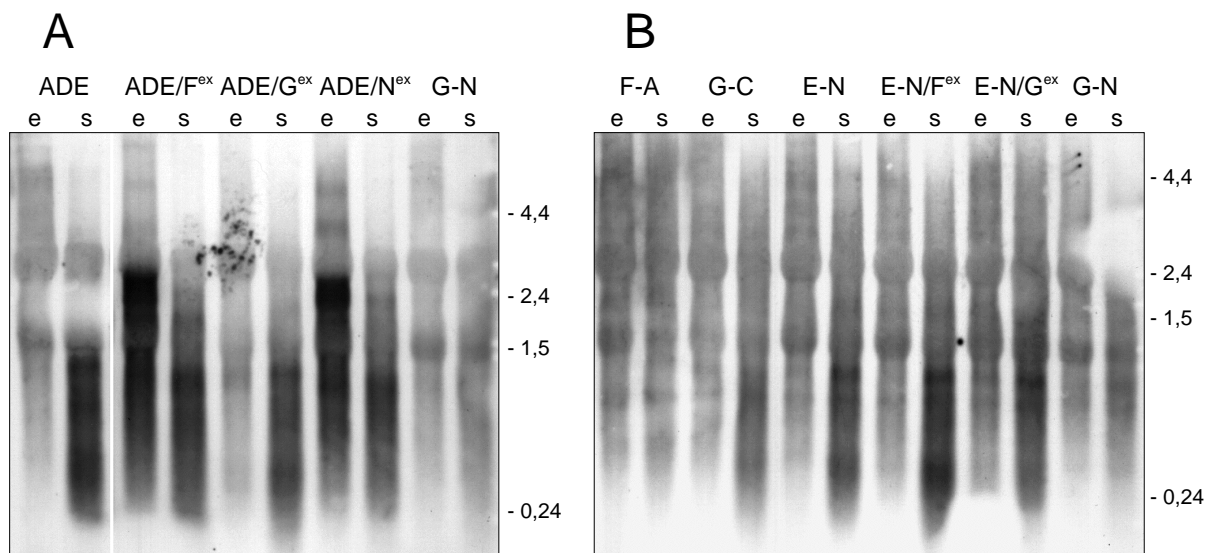
Zunächst wurden die Transformanten ADE/F<sup>ex</sup>, ADE/G<sup>ex</sup> und ADE/N<sup>ex</sup> getestet. Mit der ADE-Transformante konnten in der exponentiellen Wachstumsphase nur geringe Mengen an RNA nachgewiesen werden, die mit der 5′-D-Sonde hybridisierten (Abb. 9A). In der stationären Wachstumsphase waren ebenfalls nur geringe mRNA-Mengen nachweisbar, die von der Größe her *gvpDE* überspannten. Zusätzlich hybridisierten stationär größere Mengen kleinerer Transkripte (<2 kb) mit der 5′-D-Sonde, die nur noch den Leserahmen von *gvpD* enthielten.

Das Expressionsmuster der ADE/G<sup>ex</sup>-Transformante war fast identisch mit demjenigen der ADE-Transformante (Abb. 6A)

Sowohl die ADE/F<sup>ex</sup>-Transformante als auch die ADE/N<sup>ex</sup>-Transformante unterschied sich von der ADE-Transformante dadurch, dass exponentiell deutlich größere Mengen RNA mit der 5'-D-Sonde hybridisierten (Abb. 9A). Hier waren vor allem ein über 2,4 kb großes Transkript in größeren Mengen nachweisbar, das die Leserahmen von *gvpD* und *gvpE* beinhaltete. Dieses war in den Expressionsmustern der stationären Wachstumsphase allerdings nicht mehr vorhanden, welche wieder demjenigen der ADE-Transformante ähnelten.

Mit der G-N-Transformante waren weder in der exponentiellen noch in der stationären Wachstumsphase größere Mengen *gvpD*-spezifischer Transkripte nachweisbar (Abb. 9A).

Dieses schwache Expressionsmuster wurde bereits in Transformanten gesehen, die die gesamte mc-vac-Region in dem Vektorplasmid pWL102 (mc- bzw. BN-Transformante) trugen (Röder, 1997; diese Arbeit, Daten nicht gezeigt). Die Anwesenheit der gesamten mc-vac-Region in den *Hf. volcanii*-Transformanten schien dabei einen reduktiven Einfluß auf die Transkription an den beiden Promotoren mcA und mcD zu haben.



**Abb. 9.** Northern-Analyse zum Nachweis der mc-*gvpD*-Transkripte in den *Hf. volcanii*-Transformanten.

**A.** Transformanten mit ADE, ADE/F<sup>ex</sup>, ADE/G<sup>ex</sup>, ADE/N<sup>ex</sup> und G-N. **B.** Transformanten mit F-A, G-C, E-N, E-N/F<sup>ex</sup>, E-N/G<sup>ex</sup> und G-N. In jeder Spur wurden 5 µg Gesamt-RNA, die (e) aus der exponentiellen Wachstumsphase (OD<sub>600</sub> = 0,2-0,3), und (s) aus der stationären Wachstumsphase (OD<sub>600</sub> >2) isoliert wurden. Die RNA wurde mittels 1,2%igen Formaldehyd-enthaltenden Agarosegelen aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit der mc-*gvpD*-spezifischen RNA-Sonde (5'D-Sonde, Abb. 6) hybridisiert. Die Längen (in kb) des RNA-Größenstandards sind rechts angegeben. Eine Kontrolle von Quantität und Qualität der untersuchten Gesamt-RNA anhand der Schärfe der Banden der 23S rRNA und der 16S rRNA ist in Abb. 8C dargestellt.

Die Transformanten mit längeren mc-vac-Subfragmenten (F-A, G-C, E-N, E-N/F<sup>ex</sup> und E-N/G<sup>ex</sup>) zeigten alle ein ähnliches Expressionsmuster wie die G-N-Transformante (Abb. 9B). In allen Transformanten waren sowohl während der exponentiellen als auch während der stationären Wachstumsphase kaum *gvpD*-spezifische Transkripte nachweisbar)

Zusammenfassend zeigten die Northern-Analysen, dass eine geringe mcA-Promotor-Aktivität in der exponentiellen Wachstumsphase durch die Überexpression von *gvpD* erreicht werden konnte. Aus der Tatsache, dass große GvpD-Mengen zu geringen *gvpA*-mRNA-Mengen führten, kann man schließen, dass GvpD als Repressor wirkt. Dabei bleibt jedoch zu klären, ob GvpD am mcA-Promotor wirkt und die Rekrutierung der RNA-Polymerase inhibiert oder ob GvpD mit GvpE interagiert und so die Aktivierung des mcA-Promotors verhindert.

Die Ergebnisse der Northern-Analysen zeigten weiterhin, dass die Expression von *gvpF* zusätzlich zu *gvpADE* in den ADE/F<sup>ex</sup>- und F-A-Transformanten mit einer deutlich reduzierten *gvpA*-mRNA-Menge in der exponentiellen Wachstumsphase korrelierte und daher GvpF möglicherweise an der Regulation des *gvpA*-Promotors beteiligt ist. Allerdings konnte mit der E-N/F<sup>ex</sup>-Transformante keine weitere Reduktion der *gvpA*-mRNA-Menge im Vergleich mit der E-N-Transformante gezeigt werden, was der Funktion eines Repressors widerspricht.

Auch die zusätzliche Expression von *gvpN* ging mit einer niedrigeren *gvpA*-mRNA-Menge in der exponentiellen Wachstumsphase einher und spricht dafür, dass auch GvpN möglicherweise an der Regulation des *gvpA*-Promotors beteiligt sein könnte.

Der Nachweis der Transkripte, die vom *gvpD*-Promotor aus in den hier analysierten Transformanten gebildet wurden, zeigte deutlich stärkere Signale für das über 2,4 kb große *gvpDE*-Transkript in den Transformanten ADE/F<sup>ex</sup> und ADE/N<sup>ex</sup> als in den ADE- und ADE/G<sup>ex</sup>-Transformanten. Die Transformanten mit längeren mc-vac-Fragmenten als dem ADE-Fragment zeigten alle wesentlich geringere Mengen an Transkripten, die vom *gvpD*-Promotor aus gebildet wurden. Die Produktion größerer Mengen an GvpD in der exponentiellen Wachstumsphase der Transformanten ADE/F<sup>ex</sup> und ADE/N<sup>ex</sup> könnte die geringere Mengen an *gvpA*-mRNA in diesen Transformanten erklären. Ansonsten lassen sich keine Korrelationen zwischen der Expression am *gvpD*-Promotor und der Regulation des *gvpA*-Promotors aus den hier dargestellten Northern-Analysen ableiten.

## 2. Reinigung von mc-vac-Proteinen als His-tag-Fusionsproteine aus *E. coli*

Für die Generierung von Antiseren wurden die Proteine GvpD, GvpE und GvpF als His-tag-Fusionsproteine in *E. coli* produziert, mittels Metallionenaffinitätschromatographie gereinigt und Kaninchen injiziert. Die gereinigten Proteine wurden über die Antiserenherstellung hinaus auch für in *vitro*-Analysen verwendet, bei denen Protein-Protein-Interaktionen zwischen Gvp-Proteinen nachgewiesen werden sollten. Aus diesem Grund wurden zusätzlich zu GvpD, GvpE und GvpF ebenfalls GvpG, GvpC und GvpN auf die gleiche Weise gereinigt.

Für die Herstellung und Reinigung der His-tag-Fusionsproteine wurden die entsprechenden Leserahmen der Gene mittels PCR aus der genomischen DNA von *Hf. mediterranei* amplifiziert und mittels über Primer künstlich eingefügte Schnittstellen in den His-tag-Expressionsvektor pQE8 inseriert. Die Insertionen resultierten in Fusionskonstrukten, die für die entsprechenden Proteine mit einem N-terminalen Hexahistidin-tag kodierten. Die Expression der His-tag-Fusionsproteine erfolgte in *E. coli* M15 [pREP4] und wurde durch die Zugabe von IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid) induziert. Die Reinigung der His-tag-Fusionsproteine wurde unter denaturierenden Bedingungen in 8 M Harnstoff mit Hilfe von Ni-NTA-Agarose durchgeführt. Die Elution der Gvp-His-Proteine erfolgte mit 500 mM Imidazol. Das Fusionsprotein GvpD-His konnte in *E. coli* in großer Menge produziert werden und erschien nach der Reinigung mit Ni-NTA im SDS-Polyacrylamidgel als Doppelbande bei ca. 61 kDa (Abb. 10, GvpD-His, Spuren 5-8). Dabei stellt eine der Banden vermutlich eine modifizierte Version des Proteins dar.

In dem Eluat waren nach der Reinigung über die Ni-NTA-Matrix allerdings immer noch viele Proteine als Verunreinigung, die auch nicht durch das Optimieren der Bedingungen bei der Bindung und den Waschschritten entfernt werden konnten. Die Affinitätschromatographie wurde daher weiter optimiert, indem das  $\text{Ni}^{2+}$ -Metallion aus dem NTA-Komplex mit EDTA entfernt und durch andere zweiwertige Metallionen wie  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  oder  $\text{Zn}^{2+}$  ersetzt wurde. Die unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der verschiedenen Metallionen in den hergestellten Metall<sup>2+</sup>-NTA-Matrices führten zu thermodynamisch und kinetisch veränderten Komplexen mit den Histidin-Liganden der Gvp-His-Proteine und dadurch zu unterschiedlichen Affinitäten der Matrices sowohl zu den Gvp-His-Proteinen als auch zu *E. coli*-Proteinen (Porath *et al.*, 1975; Hochuli *et al.*, 1988).

Die höhere Affinität von  $\text{Cu}^{2+}$  zu den Histidin-Liganden im Vergleich zu  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  oder  $\text{Zn}^{2+}$  resultierte in höheren Mengen verunreinigender Proteine in den Eluaten und war daher zur Verbesserung der Proteinreinigung nicht geeignet (Daten nicht gezeigt). Die Affi-

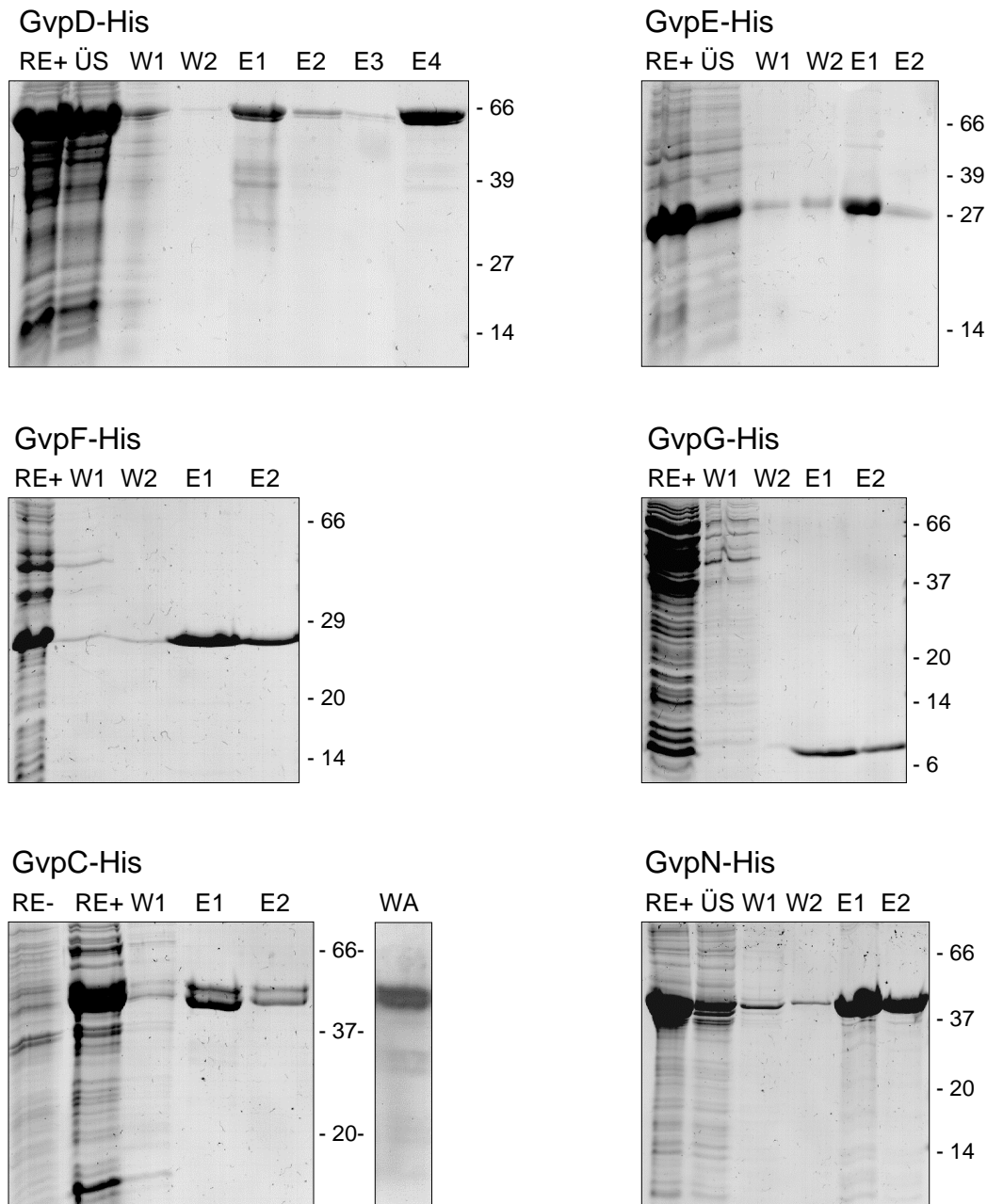


nitätsmatrix mit  $\text{Co}^{2+}$  als Zentralatom lieferte sehr saubere Eluate ohne größere Mengen unspezifisch gebundener *E. coli*-Proteine, allerdings war die Proteinkonzentration der Gvp-His-Proteine in den Eluaten aufgrund der geringeren Affinität von  $\text{Co}^{2+}$  zu den Histidin-Liganden geringer als bei den Eluaten mit der Ni-NTA-Agarose. Eine anschließende Überprüfung der Co-NTA-Matrix zeigte, dass noch große Mengen Gvp-His-Protein an der Matrix gebunden waren (Daten nicht gezeigt). Die besten Resultate konnten letztlich mit der Zn-NTA-Matrix erzielt werden.

Für die Reinigung von GvpD-His wurde nacheinander sowohl eine Ni-NTA-Matrix als auch eine Zn-NTA-Matrix verwendet. Nach dem ersten Reinigungsschritt mit Hilfe der Ni-NTA-Matrix wurden die Eluate durch Dialyse von Imidazol befreit und in einem zweiten Schritt mittels Zn-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Mit diesem Reinigungsverfahren konnten große Mengen von GvpD-His in zufriedenstellender Reinheit gewonnen werden (Abb. 10, GvpD-His). Das Fusionsprotein GvpE-His konnte ebenfalls in großer Menge in *E. coli* produziert werden und erschien im SDS-Polyacrylamidgel als eine Bande bei ca. 25 kDa. Die Reinigung von GvpE-His erfolgte in einem Schritt mit Hilfe der Zn-NTA-Matrix (Abb. 10, GvpE-His).

Die Reinigung der His-tag-Fusionsproteine GvpF-His, GvpG-His, GvpC-His und GvpN-His erfolgte mittels Ni-NTA-Matrix. In diesem Fall konnten die His-tag-Fusionsproteine mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie in zufriedenstellender Menge und Reinheit isoliert werden (Abb. 10).

Die rekombinanten Proteine erschienen im SDS-Polyacrylamidgel als Banden bei ca. 27 kDa (GvpF-His), ca. 10 kDa (GvpG-His) und ca. 40 kDa (GvpN-His). GvpC-His erschien als Doppelbande bei ca. 40 und 43 kDa. Die Western-Analyse mit einem GvpC-spezifischen Antiserum (Englert & Pfeifer, 1993) zeigte, dass beide Banden mit dem Antiserum reagierten. Möglicherweise kam die Doppelbande hier durch einen proteolytischen Abbau am C-Terminus zustande.



**Abb. 10.** SDS-PAGE der mittels Metallionenaffinitätschromatographie aus zellfreien Extrakten von *E. coli* gereinigten mc-vac-Proteine GvpD-His, GvpE-His, GvpF-His, GvpG-His, GvpC-His und GvpN-His. Nach verschiedenen Reinigungsschritten der entsprechenden Proteine wurden 10 µl-Aliquots mit 12,5%igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Dabei wurden Rohextrakte vor der Induktion mit IPTG (RE-), Rohextrakte nach der Induktion mit 1 mM IPTG (RE+), der Überstand nach der Inkubation mit der Metallionen-NTA-Agarose (ÜS), die beiden ersten Waschschrte nach der Inkubation mit der Affinitätschromatographiematrix (W1 und W2) und die Elutionsschritte (E1, E2, E3 und E4) miteinander verglichen. GvpF-His, GvpG-His, GvpC-His und GvpN-His wurden mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt, während GvpE-His mittels Zn-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt wurde. Für die Reinigung von GvpD-His wurde eine kombinierte Affinitätschromatographie durchgeführt, bei der eine Ni-NTA-Matrix (E1, E2 und E3) sowie eine Zn-NTA-Matrix (E4) eingesetzt wurde. Gereinigtes GvpC-His wurde in einer Western-Analyse mit einem GvpC-spezifischen Antiserum (Englert & Pfeifer, 1993) untersucht (WA). Die molekularen Massen (in kD) des Protein-Größenstandards sind rechts angegeben.

Für die Generierung von Antiseren in Kaninchen wurden die gereinigten Proteine GvpD-His und GvpE-His gegen 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0 dialysiert. Im Falle von GvpF-His zeigte sich, dass dieses Protein in diesem Puffer über längere Zeit nicht stabil war und abgebaut wurde. Daher wurde GvpF-His für die Antiserenproduktion gegen einen Puffer dialysiert, der 10 mM Tris-HCl pH 8,0 und 2,5 M KCl enthielt. Die hohe Salzkonzentration sollte dabei nicht nur dazu dienen, möglichst native Bedingungen für das halophile Protein zu schaffen, sondern auch die Aktivität einer möglicherweise aus *E. coli* bei der Reinigung in geringen Mengen mitverschleppten Protease zu inhibieren. Die Aufbewahrung von GvpF-His in diesem Puffer konnte dessen Abbau auch bei längerer Aufbewahrung verhindern.

### 3. Zeitliches Auftreten von GvpD, GvpE und GvpF während des Wachstums von *Hf. mediterranei*

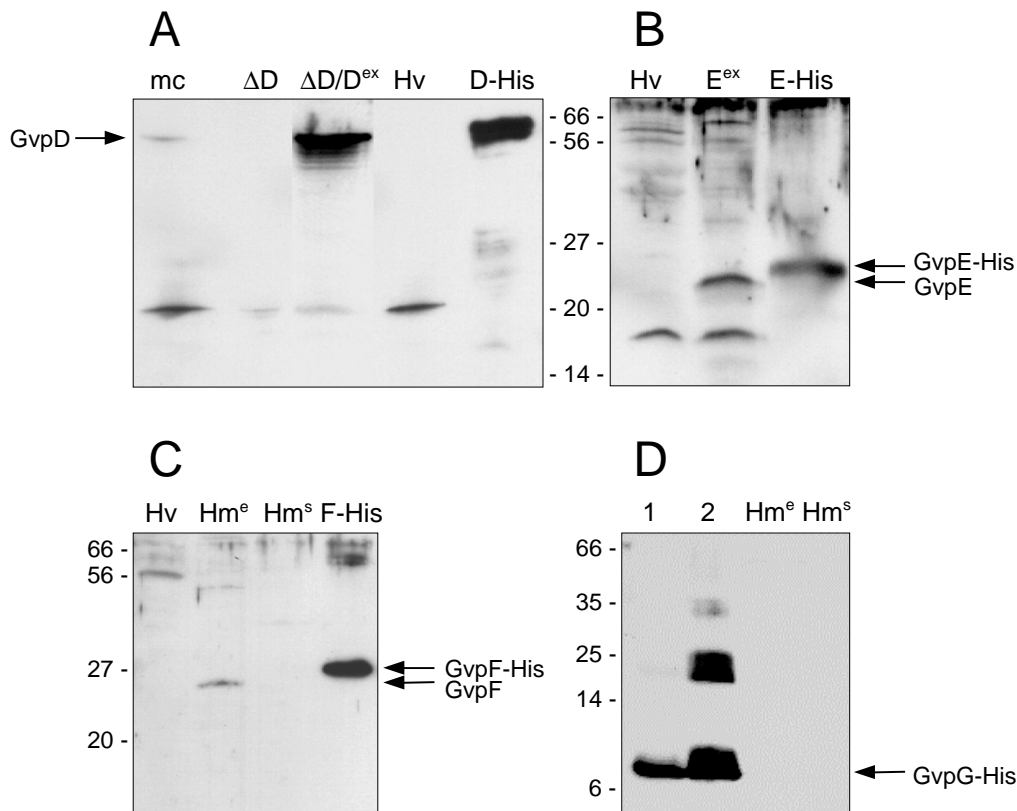
#### 3.1. Test der Antiseren

Für die Untersuchung des zeitlichen Auftretens der Proteine GvpD, GvpE und GvpF in Kulturen von *Hf. mediterranei* wurden Antiseren gegen die entsprechenden gereinigten His-tag-Fusionsproteine in Kaninchen produziert. Für die Charakterisierung der Antiseren gegen GvpD und GvpE wurden Western-Analysen mit löslichen Proteinen aus verschiedenen Transformanten von *Hf. volcanii* durchgeführt, die die entsprechenden Leserahmen von *gvpD* und *gvpE* unter der Kontrolle des nativen *mcD*-Promotors oder die entsprechenden Leserahmen unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors in pJAS35 enthielten ( $D^{ex}$  bzw.  $E^{ex}$ ) und dadurch große Mengen GvpD und GvpE produzierten. Das Antiserum, das gegen GvpD-His produziert wurde, reagierte mit GvpD (61 kDa) in einer Probe mit löslichen Proteinen aus einer stationär gewachsenen Transformante von *Hf. volcanii*, die die gesamte *mc-vac*-Region (*mc*) trug (Abb. 11A). Eine Transformante mit dem  $\Delta D$ -Konstrukt zeigte dagegen keine entsprechende Reaktion mit dem Antiserum. Die zusätzliche Anwesenheit des  $D^{ex}$ -Konstrukts in einer  $\Delta D/D^{ex}$ -Transformante führte jedoch zu einem starken Signal mit dem GvpD-Antiserum bei 61 kDa. Unspezifische Reaktionen des GvpD-Antiserums gab es vor allem mit einem Protein mit der apparenten molekularen Masse von 20 kDa aus *Hf. volcanii* (Abb. 11A, Hv).

Das Antiserum, das gegen GvpE-His produziert wurde, reagierte mit GvpE (22 kDa) in einer Probe mit löslichen Proteinen aus einer stationär gewachsenen Transformante von *Hf. volcanii*, die *gvpE* unter Kontrolle des *fdx*-Promotors exprimierte (Abb. 11B,  $E^{ex}$ ). Unspezifische Reaktionen des GvpE-Antiserums gab es v.a. mit einem Protein aus *Hf. volcanii* mit der apparenten molekularen Masse von ca. 17 kDa, das von der Größe allerdings zu klein war, als dass es sich dabei um GvpE hätte handeln können. Die Laufweite von GvpE im Vergleich mit dem gereinigten GvpE-His zeigte, dass GvpE im Polyacrylamidgel nach der elektrophoretischen Auftrennung etwas kleiner detektiert wurde als das entsprechende GvpE-His (Abb. 11B,  $E^{ex}$  und E-His). Der Unterschied in der Laufweite entsprach dabei der größeren Masse des GvpE-His aufgrund des His-tags.

Das Antiserum, das gegen GvpF-His produziert wurde, reagierte mit GvpF (24 kDa) in einer Probe mit löslichen Proteinen aus einer exponentiellen Kultur von *Hf. mediterranei*. In einer Probe aus einer stationären Kultur von *Hf. mediterranei* war dagegen kein GvpF nachweisbar. Unspezifische Reaktionen des GvpF-Antiserums mit löslichen Proteinen aus *Hf.*

*volcanii* und *Hf. mediterranei* waren erfreulicherweise nur in sehr geringem Maße vorhanden (Abb 11C).



**Abb. 11.** Qualität und Spezifität der Antiseren, die gegen mcGvpD-His, mcGvpE-His, mcGvpF-His und pGvpG gerichtet sind. Für die Western-Analysen wurden 20  $\mu$ g lösliches Gesamtprotein aus der stationären Wachstumsphase und 0,1  $\mu$ g gereinigtes Protein mit 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembranen übertragen und mit den entsprechenden Antiseren inkubiert. Die molekularen Massen (in kDa) der Protein-Größenstandards sind neben den Abbildungen angegeben. Die Pfeile markieren die Laufweiten der detektierten Proteine. **A.** Antiserum gegen mcGvpD-His. Getestet mit löslichen Proteinen von *Hf. volcanii* (Hv), den *Hf. volcanii*-Transformanten mc,  $\Delta D$  und  $\Delta D/D^{ex}$  sowie gereinigtem GvpD-His. **B.** Antiserum gegen mcGvpE-His. Getestet mit löslichen Proteinen von *Hf. volcanii* (Hv), der *Hf. volcanii*-Transformante  $E^{ex}$  sowie gereinigtem GvpE-His. **C.** Antiserum gegen mcGvpF-His. Getestet mit löslichen Proteinen aus *Hf. volcanii* (Hv) sowie löslichen Proteinen aus der exponentiellen ( $Hm^e$ ) und der stationären ( $Hm^s$ ) Wachstumsphase von *Hf. mediterranei* und gereinigtem GvpF-His. **D.** Antiserum gegen pGvpG. Getestet mit 0,1  $\mu$ g gereinigtem mcGvpG-His in 8 M Harnstoff (1), 0,1  $\mu$ g gereinigtem mcGvpG-His in 2,5 M KCl (2) und löslichen Proteinen aus der exponentiellen ( $Hm^e$ ) und der stationären ( $Hm^s$ ) Wachstumsphase von *Hf. mediterranei*.

Ein bereits vorhandenes Antiserum, das gegen GvpG aus der p-vac-Region von *H. salinarum* (pGvpG-Antiserum, Offner & Pfeifer, 1995) generiert wurde, reagierte auch mit gereinigtem mcGvpG von *Hf. mediterranei* (Abb. 11D). Dabei zeigte sich in der Western-Analyse, dass das Antiserum in einer Probe mit gereinigtem mcGvpG-His mit dem mcGvpG-His-Monomer (10 kDa) reagierte. Ein Aliquot dieser Probe wurde schrittweise gegen Puffer dialysiert, die zu einer Endkonzentration von 2,5 M KCl in der Probe führten, um eine Rückfaltung des halo-

philen Proteins zu erreichen. In dieser Probe konnten zusätzlich zu der 10 kDa-Bande noch Signale bei ca. 20 kDa und ca. 30 kDa detektiert werden. Eine Reaktion des Antiserums mit eventuell in geringen Mengen vorhandenen verunreinigenden Proteinen in der Probe mit mcGvpG-His ist auszuschließen, da diese sonst auch in der Probe mit 8 M Harnstoff nachgewiesen worden wären. Die Anwesenheit der Banden bei ca. 20 kDa und ca. 30 kDa deutet daher auf eine oligomere Form von GvpG bei 2,5 M KCl hin.

Mit dem pGvpG-spezifischen Antiserum konnte mcGvpG in Proben mit löslichen Proteinen von *Hf. mediterranei* hingegen nicht nachgewiesen werden. Die Vorversuche mit gereinigtem GvpG-His zeigten zwar, dass das pGvpG-spezifische Antiserum auch mit mcGvpG reagierte, in den Proben mit löslichen Proteinen von *Hf. mediterranei* war die Konzentration von mcGvpG vermutlich zu gering, um einen positiven Nachweis mit dem pGvpG-Antiserum zu erhalten

### **3.2. Western-Analysen zur Untersuchung des zeitlichen Auftretens von GvpD, GvpE und GvpF während des Wachstums von *Hf. mediterranei***

Für die Untersuchung des zeitlichen Auftretens der Proteine GvpD, GvpE und GvpF während des Wachstums von *Hf. mediterranei* wurden Zellen in Medium mit 25% Salz kultiviert. Bei dieser Salzkonzentration wird die mc-vac-Region exprimiert und *Hf. mediterranei* produziert in der stationären Wachstumsphase Gasvesikel. Während des Wachstums von *Hf. mediterranei* wurden sieben Proben entnommen und die löslichen Proteine für die Western-Analysen isoliert.

Gasvesikel wurden als lichtreflektierende Partikel innerhalb der Zellen von *Hf. mediterranei* unter dem Phasenkontrastmikroskop detektiert. Solche Partikel waren in den Proben aus der stationären Wachstumsphase (Proben 5-7) zu sehen (Abb. 12 oben).

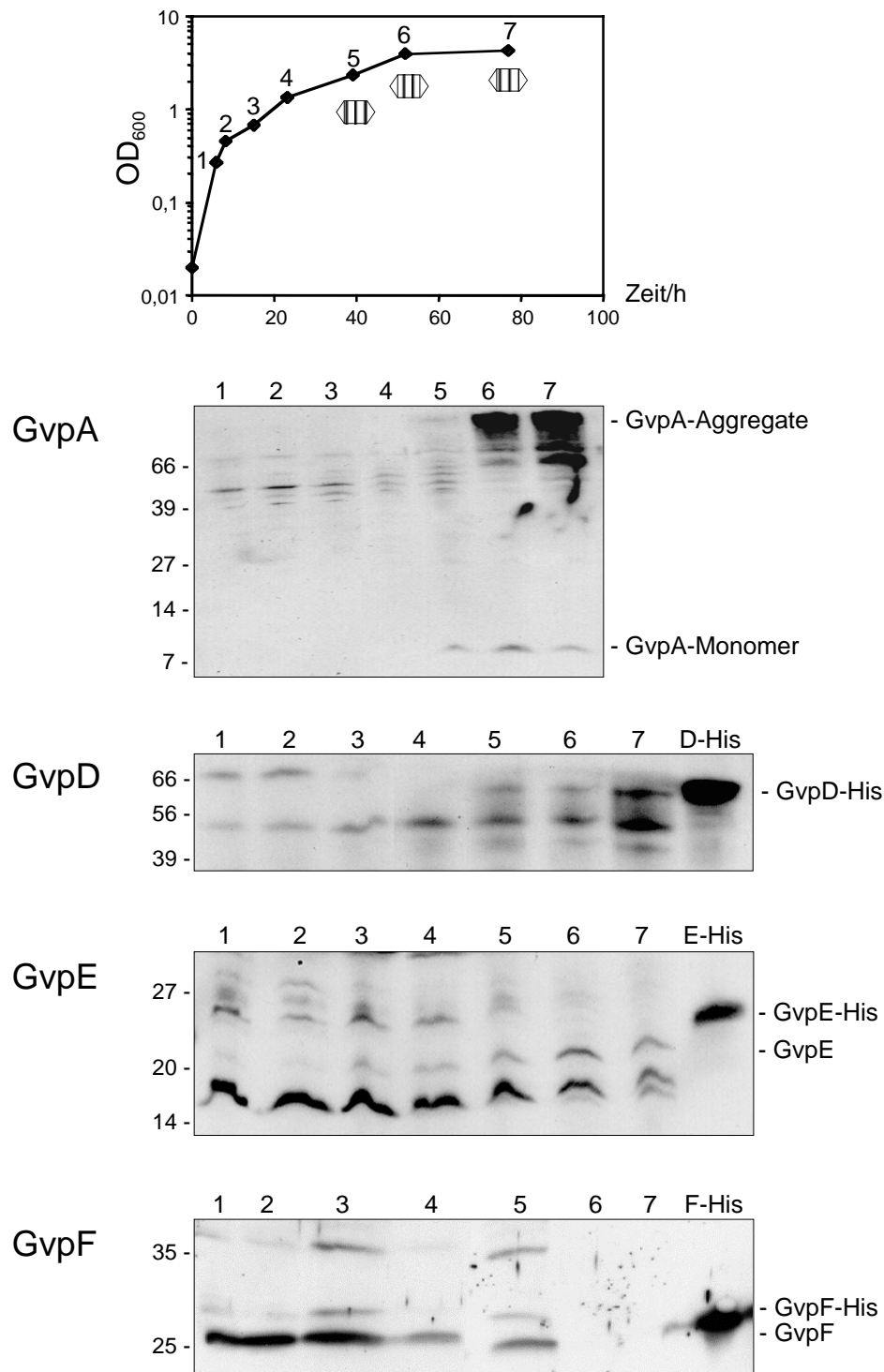
Für den Nachweis der entsprechenden Proteine wurden die gegen mcGvpD, mcGvpE und mcGvpF gerichteten Antiseren verwendet, sowie ein Antiserum, das gegen mc-vac-Gasvesikel gerichtet war und spezifisch mit mcGvpA reagierte (Englert & Pfeifer, 1993).

Mit dem GvpA-spezifischen Antiserum konnte GvpA in der monomeren Form (8 kDa), sowie Aggregate von GvpA in der stationären Wachstumsphase (Proben 5-7) nachgewiesen werden (Abb. 12, GvpA). Das Auftreten von GvpA war zeitlich identisch mit dem Auftreten der Gasvesikel in *Hf. mediterranei*. Mit dem GvpD-spezifischen Antiserum konnte GvpD mit der molekularen Masse von 61 kDa ebenfalls in den Proben 5-7 nachgewiesen werden (Abb. 12, GvpD). Das Antiserum reagierte außerdem unspezifisch mit Proteinen aus *Hf. mediterranei* mit apparenten molekularen Massen von 49 und 67 kDa. Aufgrund der

deutlich unterschiedlichen Größen zu GvpD-His konnte es sich bei diesen Proteinen jedoch nicht um GvpD handeln. Somit erschien GvpD in nachweisbaren Mengen nur in der stationären Wachstumsphase.

Das GvpE-spezifische Antiserum reagierte sehr stark mit einem Protein mit der apparenten molekularen Masse von ca. 17 kDa aus *Hf. mediterranei*, welches allerdings zu klein war, als dass es sich dabei hätte um GvpE handeln können. Da in dem nahe verwandten Organismus *Hf. volcanii*, der kein *gvpE* besitzt, eine ähnliche Bande erscheint (Abb. 11B) ist es auch unwahrscheinlich, dass es sich hierbei um ein Abbauprodukt von GvpE handelte. Mit dem GvpE-spezifischen Antiserum konnte GvpE mit der molekularen Masse von 22 kDa in den Proben 3-7 nachgewiesen werden (Abb. 12, GvpE). Die nachweisbare Bildung des Transkriptionsaktivators beginnt somit zeitlich vor der Bildung der Gasvesikel. GvpE ist dann während der gesamten stationären Wachstumsphase nachweisbar und die Signalstärke in der Western-Analyse korreliert mit der Signalstärke des GvpA-Nachweises (Abb. 12). GvpE war in den löslichen Proteinen aus *Hf. mediterranei* jedoch nur sehr schwer detektierbar, weswegen für die Western-Analysen 40 statt der üblichen 20 µg eingesetzt wurden. Wie in den Western-Analysen zum Test der Antiseren wurde auch hier GvpE etwas kleiner detektiert als GvpE-His (vgl. Abb. 11B, E<sup>ex</sup> und E-His). Das GvpE-Antiserum reagierte noch mit einem weiteren Protein aus *Hf. mediterranei* mit der apparenten molekularen Masse von ca. 26 kDa, welches jedoch von der Masse zu groß war, als dass es sich dabei um GvpE hätte handeln können.

Mit dem GvpF-spezifischen Antiserum konnte GvpF mit der molekularen Masse von 24 kDa in den Proben 1-5 nachgewiesen werden (Abb 12, GvpF). Dabei war die Signalstärke in den Proben 1-3 am größten. In den Proben 4 und 5 war GvpF in wesentlich geringeren Mengen vorhanden, in den Proben 6 und 7 ließ sich das Protein nicht mehr nachweisen. Das GvpF-Antiserum reagierte in geringem Maße unspezifisch mit Proteinen aus *Hf. mediterranei* mit apparenten molekularen Massen von 27 und 35 kDa.

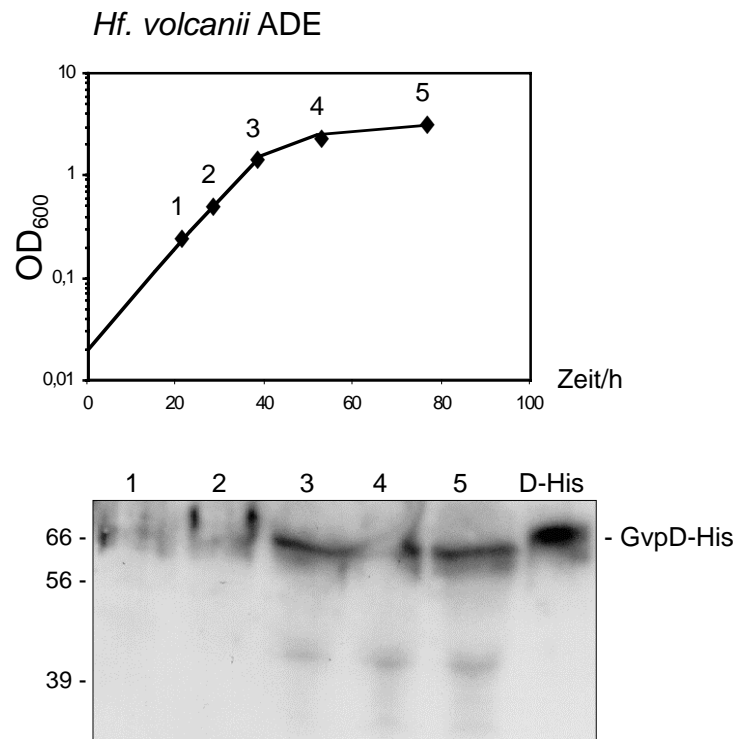


**Abb. 12.** Bildung von Gasvesikeln, GvpA, GvpD, GvpE und GvpF während des Wachstums von *Hf. mediterranei*. Die Wachstumskurve mit den Zeitpunkten der Probenentnahme ist ganz oben in der Abbildung dargestellt. Die Zeitpunkte, bei denen eine Gasvesikelbildung unter dem Lichtmikroskop beobachtbar war, sind mit schematischen Gasvesikeln gekennzeichnet. Für den Nachweis der Bildung der entsprechenden Proteine wurden sieben Proben während des Wachstums von *Hf. mediterranei* in 25% Salz-Medium entnommen. Für die Western-Analysen wurden je 20 µg (GvpA, GvpD und GvpF) bzw. 40 µg (GvpE) lösliches Gesamtprotein mit 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembranen transferiert und mit den entsprechenden Antiseren inkubiert. Als Kontrolle wurde jeweils 0,1 µg des gereinigten Gvp-His eingesetzt. Die molekularen Massen (in kD) der Protein-Größenstandards sind links angegeben. Die Bezeichnungen rechts markieren die Laufweiten der detektierten Proteine.



### 3.3. Western-Analysen zur Untersuchung des zeitlichen Auftretens von GvpD während des Wachstums der *Hf. volcanii*-ADE-Transformante

Das zeitliche Auftreten der beiden regulatorischen Proteine GvpD und GvpE wurde auch in Transformanten von *Hf. volcanii* untersucht, die das ADE-Konstrukt enthielten. Da die Northern-Analysen mit diesen Transformanten zeigten, dass die Leserahmen von *gvpD* und *gvpE* unter der Kontrolle des mcD-Promotors in diesem Konstrukt nicht ausreichten, um eine vollständige Regulation des mcA-Promotors zu erreichen, war es hier von besonderem Interesse, das zeitliche Auftreten von GvpD und GvpE zu untersuchen und mit dem zeitlichen Auftreten dieser beiden Proteine in *Hf. mediterranei* zu vergleichen. Während des Wachstums der *Hf. volcanii*-Transformante mit dem ADE-Konstrukt wurden fünf Proben zur Isolierung der löslichen Proteine für die Western-Analysen entnommen. Mit dem GvpD-spezifischen Antiserum konnte GvpD in den Proben 3-5 nachgewiesen werden (Abb. 13). Das Antiserum reagierte außerdem unspezifisch mit einem Protein aus *Hf. volcanii* mit der apparenten molekularen Masse von ca. 39 kDa. Entsprechend der GvpD-Bildung in *Hf. mediterranei* erschien auch hier GvpD in nachweisbaren Mengen nur in der stationären Wachstumsphase. Mit dem GvpE-spezifischen Antiserum konnte GvpE in der *Hf. volcanii*-Transformante mit dem ADE-Konstrukt dagegen nicht nachgewiesen werden, auch nicht durch das Einsetzen von bis zu 40 µg Protein pro Nachweis (nicht gezeigt).



**Abb. 13.** Bildung von GvpD während des Wachstums der *Hf. volcanii*-ADE-Transformante. Die Wachstumskurve von *Hf. volcanii* ADE mit den fünf Zeitpunkten der Probenentnahme ist oben in der Abbildung dargestellt. Für die Western-Analysen wurden je 20 µg lösliches Gesamtprotein in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit dem GvpD-spezifischen Antiserum inkubiert. Als Kontrolle wurde 0,1 µg gereinigtes GvpD-His eingesetzt. Die molekularen Massen (in kD) der Protein-Größenstandards sind links angegeben.

#### 4. Untersuchung der Regulation des mcA-Promotors mit dem Reportergen *bgaH*

Die Northern-Analysen mit *Hf. volcanii*-Transformanten, die Teile der mc-vac-Region aus dem G-N-Bereich trugen, erbrachten bereits Hinweise auf die Beteiligung von *gvpF* an der Regulation der Gasvesikelbildung. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass die Bildung großer Mengen von GvpD durch das D<sup>ex</sup>-Konstrukt in der exponentiellen Wachstumsphase ausreichte, um die *gvpA*-mRNA-Bildung in dieser Phase des Wachstums deutlich zu reduzieren. In den nachfolgend dargestellten Experimenten wurde die Regulation des mcA-Promotors durch die beiden Regulatoren GvpD und GvpE mit Hilfe des Reportergens *bgaH* in einer quantitativeren Weise untersucht. Weiterhin sollte aber auch der Einfluss der möglicherweise an der Regulation beteiligten Gene *gvpF* und *gvpG* untersucht werden. Das *bgaH*-Reportergen stammt aus *Hf. lucentensis* (früher *Hf. alicantei*) und kodiert für ein Protein mit einer  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (Holmes *et al.*, 1997; Holmes & Dyll-Smith, 2000). Da das *bgaH* aus einem halophilen Archaeon stammt, eignet sich dieses Reportergen für Promotor-

studien bei Salzkonzentrationen von 2-5 M NaCl oder KCl (Patenge *et al.*, 2000; Gregor & Pfeifer, 2001).

Die Experimente mit dem Reportersystem sollten zum einen die bereits durchgeführten Northern-Analysen bestätigen bzw. ergänzen. Zum anderen sollte durch die Verwendung des *bgaH*-Reportergens eine bessere Quantifizierung der Promotoraktivität bzw. des Einflusses bestimmter regulatorischer Gene auf die Promotoraktivität erreicht werden. Für die Untersuchung der Regulation am *mcA*-Promotor wurde ein Plasmidkonstrukt benutzt, in welchem der Leserahmen des *bgaH* mit dem *mcA*-Promotor fusioniert vorlag (*mcA-bgaH*-pWL102; Abb. 14B; Gregor & Pfeifer, 2001). Die Fusion des *bgaH*-Leserahmens mit dem *mcA*-Promotor erfolgte innerhalb des *gvpA*-Leserahmens, da eine Fusion am Startcodon zu Konstrukten führte, die zwar transkribiert wurden, aber Probleme bei der Translation verursachten (Gregor & Pfeifer, 2001). Alle  $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsproteine enthielten daher am N-Terminus zusätzlich die fünf ersten Aminosäuren MVQPD des GvpA-Proteins (Abb. 14A) und ein Serin durch die Einführung der *NcoI*-Schnittstelle.

Mit dem Reportersystem wurde zunächst die basale Aktivität des *mcA*-Promotors in dem *mcA-bgaH*-pWL102-Konstrukt gemessen. Mit *Hf. volcanii*-Transformanten, die zusätzlich zu dem *mcA-bgaH*-pWL102-Konstrukt das *gvpE*-pJAS35-Konstrukt ( $E^{ex}$ ) enthalten, kann die Aktivierung des *mcA*-Promotors durch GvpE gemessen werden. Die hierbei erhaltene  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität stellt dabei ein Maß für den aktivierten, aber nicht-reprimierten Zustand des *mcA*-Promotors dar. Da für die Aktivierung des *mcA*-Promotors außer GvpE keine weiteren Gvp-Proteine benötigt werden (Röder & Pfeifer, 1996; Gregor & Pfeifer, 2001), wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in den *mcA/E<sup>ex</sup>*-Transformanten als maximal mögliche Aktivität (100%) des *mcA*-Promotors unter den gewählten Wachstumsbedingungen angesetzt. Mit Transformanten, die zusätzlich zu dem *mcA-bgaH*-pWL102-Konstrukt *gvpDE*, *gvpDEF* bzw. *gvpDEFG* im Expressionsvektor pJAS35 enthielten ( $DE^{ex}$ ,  $DEF^{ex}$ ,  $DEFG^{ex}$ , Abb. 14B), sollte der Einfluß dieser Leserahmen auf die Aktivität des *mcA*-Promotors untersucht werden. Alle *Hf. volcanii*-Transformanten, die für die Reportergenstudien mit dem *bgaH* verwendet wurden, sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

A

**TATA**

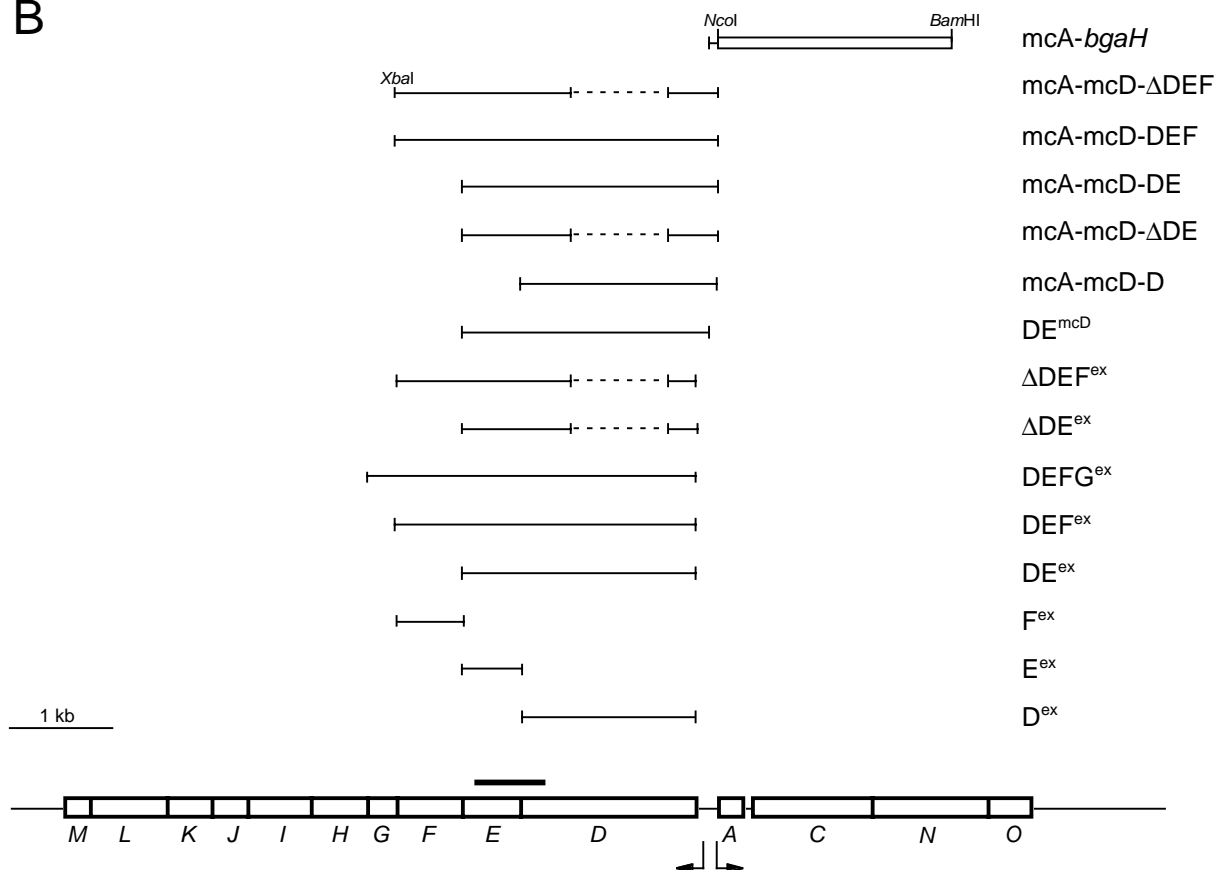
mcA      CGAGAGGTGAAACGGTTGCTGAACCAACACGAATG**ATTTTG**TTACTTGCC

+1

AACACGTTTTTCAGATGGGTATAACCCAGATCAAT**CATG**GTTTCAGCCCGAT

**M   V   Q   P   D**

B



**Abb. 14.** Sequenz des mcA-Promotors, Genkarte der mc-vac-Region und Darstellung der Konstrukte, die für die Transformation von *Hf. volcanii* für die Reportergenanalysen verwendet wurden. **A.** Promotor-Region des mc-*gvpA*-Promotors und kodierende Region der ersten fünf Aminosäuren von mcGvpA. Der Transkriptionsstartpunkt ist mit +1 bezeichnet, das ATG-Startkodon ist fett und kursiv dargestellt. Die TATA-Box ist markiert und in fetten Buchstaben geschrieben. Die ersten fünf Aminosäuren von GvpA sind im Einbuchstaben-Code unter den entsprechenden Codons dargestellt. **B.** Konstrukte, die für die Transformation von *Hf. volcanii* eingesetzt wurden, sind als Linien dargestellt, wobei gestrichelte Linien den deletierten, 918 bp *XhoI*-Bereich in *gvpD* markieren. Der *bgaH*-Leserahmen ist als Kasten dargestellt. Die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *XbaI*, *NcoI* und *BamHI*, die für die Fusion und Klonierung der Reportergenkonstrukte verwendet wurden, sind einmal repräsentativ für alle Konstrukte angegeben. Für die Einführung der *NcoI*-Schnittstelle wurde die *gvpA*-Sequenz bei der PCR an Position 4085 von TCATCA nach CCATGG geändert. Die mit „ex“ markierten Fragmente wurden in den Expressionsvektor pJAS35 inseriert. Das DE<sup>mcD</sup>-Konstrukt enthielt die *gvpDE*-Gene mit dem mcD-Promotor im Plasmidvektor pMDS20. Alle anderen Konstrukte waren mit dem *bgaH*-Leserahmen fusioniert und in den Plasmidvektor pWL102 inseriert.

**Tabelle 5.** *Hf. volcanii*-Transformanten, die für die *bgaH*-Reporteranalysen verwendet wurden

Transformante	pWL102-Konstrukt	pJAS35-Konstrukt	Einfluß der <i>gvp</i> -Gene
mcA	mcA- <i>bgaH</i>	-	-
mcA/E <sup>ex</sup> <sup>1</sup>	mcA- <i>bgaH</i>	+ <i>gvpE</i>	<i>gvpE</i>
mcA/DE <sup>ex</sup>	mcA- <i>bgaH</i>	+ <i>gvpDE</i>	<i>gvpD</i> + <i>gvpE</i>
mcA/DEF <sup>ex</sup>	mcA- <i>bgaH</i>	+ <i>gvpDEF</i>	<i>gvpD</i> + <i>gvpE</i> + <i>gvpF</i>
mcA/DEFG <sup>ex</sup>	mcA- <i>bgaH</i>	+ <i>gvpDEFG</i>	<i>gvpD</i> + <i>gvpE</i> + <i>gvpF</i> + <i>gvpG</i>
mcA/D <sup>ex</sup>	mcA- <i>bgaH</i>	+ <i>gvpD</i>	<i>gvpD</i>
mcA/F <sup>ex</sup>	mcA- <i>bgaH</i>	+ <i>gvpF</i>	<i>gvpF</i>
mcA/ΔDE <sup>ex</sup>	mcA- <i>bgaH</i>	+ <i>gvpΔDE</i>	<i>gvpE</i>
mcA/ΔDEF <sup>ex</sup>	mcA- <i>bgaH</i>	+ <i>gvpΔDEF</i>	<i>gvpE</i> + <i>gvpF</i>
mcA-mcD-D	mcA- <i>bgaH</i> -mcD- <i>gvpD</i>	-	<i>gvpD</i>
mcA-mcD-ΔDE	mcA- <i>bgaH</i> -mcD- <i>gvpΔDE</i>	-	<i>gvpE</i>
mcA-mcD-DE	mcA- <i>bgaH</i> -mcD- <i>gvpDE</i>	-	<i>gvpD</i> + <i>gvpE</i>
mcA-mcD-DEF	mcA- <i>bgaH</i> -mcD- <i>gvpDEF</i>	-	<i>gvpD</i> + <i>gvpE</i> + <i>gvpF</i>
mcA-mcD-ΔDEF	mcA- <i>bgaH</i> -mcD- <i>gvpΔDEF</i>	-	<i>gvpE</i> + <i>gvpF</i>
Transformante	pWL102-Konstrukt	pMDS20-Konstrukt	Einfluß der <i>gvp</i> -Gene
mcA/DE <sup>mcD</sup> <sup>2</sup>	mcA- <i>bgaH</i>	+ mcD- <i>gvpDE</i>	<i>gvpD</i> + <i>gvpE</i>

<sup>1</sup> ex = Leserahmen unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors im Expressionsvektor pJAS35

<sup>2</sup> mcD = Leserahmen unter der Kontrolle des eigenen mcD-Promotors in pMDS20

Zur Analyse der Regulation des mcA-Promotors mit dem Reporter gen *bgaH* wurden diese *Hf. volcanii*-Transformanten in Medium mit 3 M NaCl bei 37 °C angezogen und bis zur stationären Wachstumsphase kultiviert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen und die spezifische β-Galaktosidase-Aktivität mit dem ONPG-Test bestimmt. Es wurden jeweils mindestens drei Transformanten mit der gleichen Konstruktkombination gemessen und die zu vergleichbaren Wachstumszeiten erhaltenen β-Galaktosidase-Aktivitäten gemittelt. Als Maß für die Streuung der Werte wurde jeweils die Standardabweichungen der Aktivitäten berechnet. Zur Kontrolle wurde auch die Expression der Konstrukte mit Leserahmen aus dem Bereich von *gvpD* bis *gvpG* mittels Northern-Analysen untersucht, sowie die Anwesenheit der Proteine GvpD, GvpE und GvpF mittels Western-Analysen mit den entsprechenden Antiseren überprüft.

#### 4.1. Einfluß von GvpD, GvpE, GvpF und GvpG auf die Aktivierbarkeit des *mcA*-Promotors: Expression der Gene in pJAS35 unter *fdx*-Promotor-Kontrolle

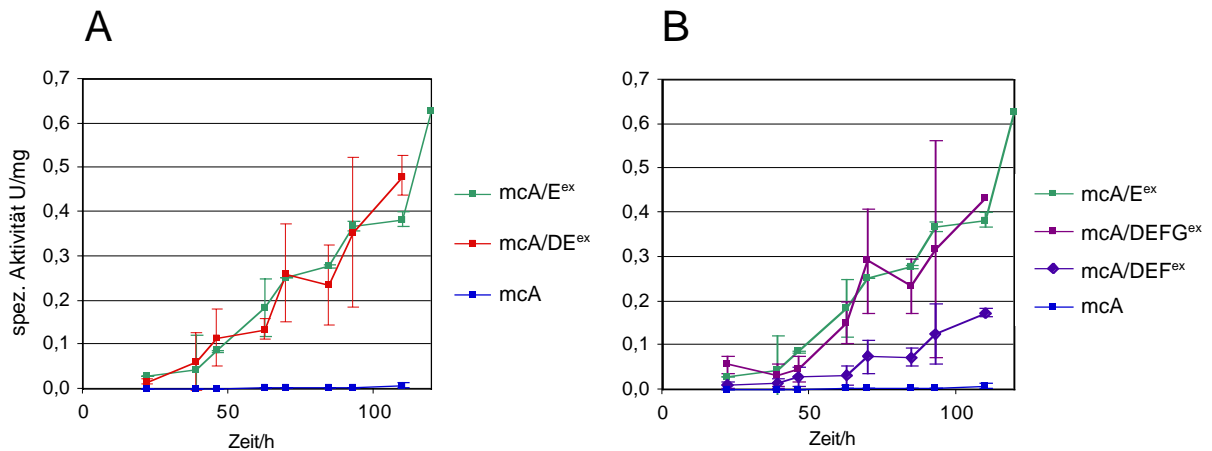
Die *mcA*-Transformanten zeigten eine sehr niedrige basale  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. In der exponentiellen Phase waren die spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten im Mittel bei 0,0003 U/mg. Im Verlauf des Wachstums stiegen die Werte bis zu einem Durchschnittswert von 0,0088 U/mg. Die spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten sind in Abb. 15 dargestellt. Für eine übersichtlichere Darstellung wurden die Aktivitäten der Transformanten *mcA/DE<sup>ex</sup>* (Abb. 15A) und *mcA/DEF<sup>ex</sup>* sowie *mcA/DEFG<sup>ex</sup>* (Abb. 15B) in separaten Diagrammen mit den Aktivitäten von *mcA* und *mcA/E<sup>ex</sup>* verglichen.

Die *mcA/E<sup>ex</sup>*-Transformanten enthielten zusätzlich zu *mcA-bgaH* den Leserahmen des Transkriptionsaktivators GvpE in dem halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35 und zeigten mit durchschnittlich 0,0273 U/mg in der exponentiellen und 0,6285 U/mg in der stationären Wachstumsphase die höchsten meßbaren Aktivitäten (Abb. 15A und B). Der Faktor für die Aktivierung der *mcA*-Promotoraktivität durch GvpE war von der exponentiellen bis zur stationären Wachstumsphase relativ konstant und betrug im Durchschnitt den Wert 82. Reporteranalysen mit *mcA*- und *mcA/E<sup>ex</sup>*-Transformanten wurden bereits von Dagmar Gregor zur Analyse der Aktivierung der *gvpA*-Promotoren durchgeführt (Gregor & Pfeifer, 2001). Sowohl die basalen, als auch die GvpE-vermittelten Aktivitäten stimmten sehr genau mit den von Gregor & Pfeifer (2001) veröffentlichten Werten überein.

Die folgenden *Hf. volcanii*-Transformanten *mcA/DE<sup>ex</sup>*, *mcA/DEF<sup>ex</sup>* und *mcA/DEFG<sup>ex</sup>* dienten dazu, weitere, regulatorisch wichtige Gene zu identifizieren. Die Analyse der *mcA/DE<sup>ex</sup>*-Transformante zeigte einen ähnlichen Aktivitätsverlauf wie die *mcA/E<sup>ex</sup>*-Transformante (Abb. 15A). In der exponentiellen Wachstumsphase betrug die spezifische Aktivität im Schnitt 0,0160 U/mg. Im weiteren Wachstumsverlauf stieg die spezifische Aktivität linear bis zur stationären Wachstumsphase auf einen Wert von 0,4817 U/mg an. In einzelnen wurden mit der *mcA/DE<sup>ex</sup>*-Transformante jedoch nicht ganz der Spitzenaktivitätswert der *mcA/E<sup>ex</sup>*-Transformante erreicht. Im Durchschnitt wurde die *mcA*-Promotoraktivität während dem gesamten Wachstum ebenfalls konstant um das 82-fache aktiviert. Die zusätzliche Expression von *gvpD* zeigte damit keine Reduktion der *mcA*-Promotoraktivität, obwohl diese aufgrund der Northern-Analysen erwartet wurde.

Mit der *mcA/DEF<sup>ex</sup>*-Transformante wurden in der exponentiellen Wachstumsphase spezifische Aktivitäten gemessen, die im Durchschnitt 0,0093 U/mg betrugen (Abb. 15B). Während des Wachstums stiegen die Aktivitätswerte bis zur stationären Wachstumsphase linear bis zu einem Höchstwert von 0,1743 U/mg an. Im Durchschnitt wurde die *mcA*-

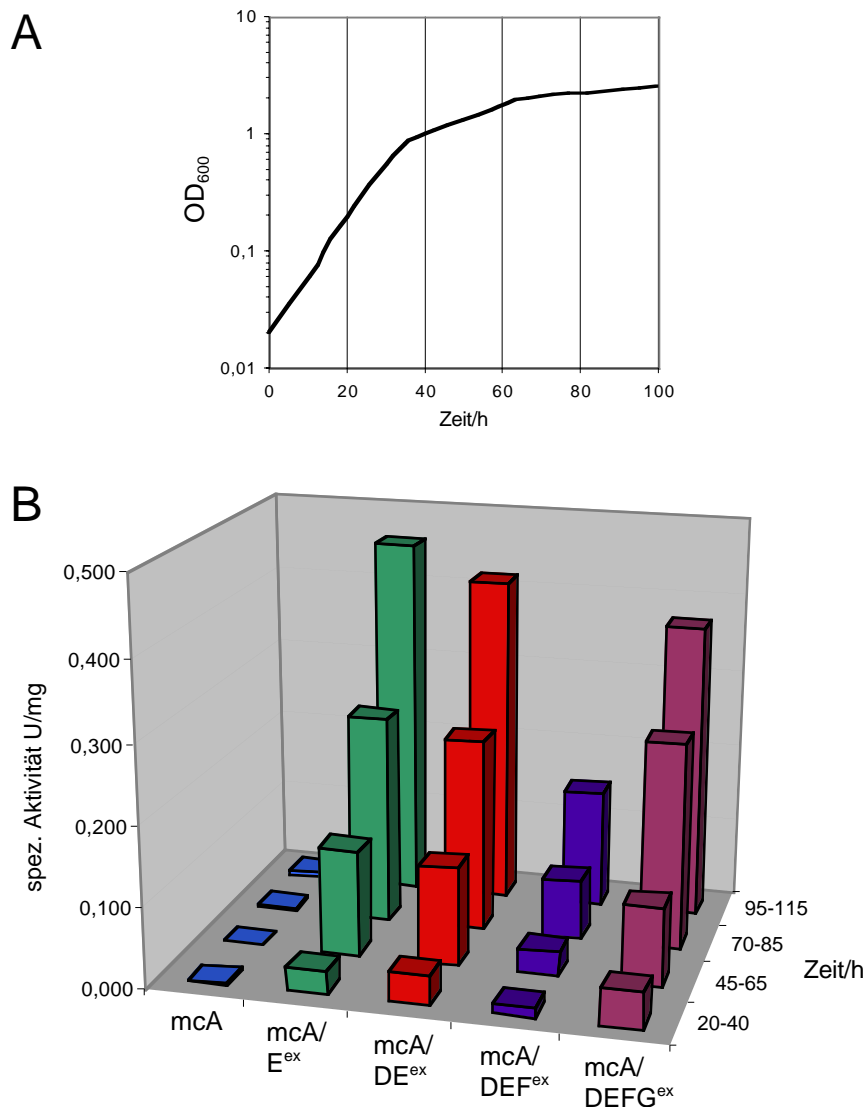
Promotoraktivität in den *mcA/DEF<sup>ex</sup>*-Transformanten während des gesamten Wachstums konstant um das 26-fache aktiviert. Das entspricht einer 3,3-fach geringeren Aktivierung als in den *mcA/E<sup>ex</sup>*- und *mcA/DE<sup>ex</sup>*-Transformanten. Diese Beobachtung ist in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Northern-Analysen mit den F-A- und ADE/F<sup>ex</sup>-Transformanten: Die zusätzliche Expression von *gvpF* führt zu einer verminderten GvpE-vermittelten Aktivierung des *mcA*-Promotors.



**Abb. 15.** Aktivitätskurven der *Hf. volcanii*-Transformanten mit den Reportergenkonstrukten *mcA*, *mcA/E<sup>ex</sup>*, *mcA/DE<sup>ex</sup>* (A) und *mcA*, *mcA/E<sup>ex</sup>*, *mcA/DEF<sup>ex</sup>* und *mcA/DEFG<sup>ex</sup>* (B) (siehe auch Tabelle 5). Die spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten wurden während des Wachstums der Transformanten mit dem ONPG-Test ermittelt. In beiden Diagrammen sind Mittelwerte der zu vergleichbaren Zeitpunkten gemessenen Aktivitäten von mindestens drei Klonen dargestellt. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken eingezeichnet.

Die Analyse der *mcA/DEFG<sup>ex</sup>*-Transformante zeigte im Schnitt einen ähnlichen Aktivitätsverlauf wie die *mcA/E<sup>ex</sup>*- bzw. *mcA/DE<sup>ex</sup>*-Transformanten. Die gemessenen Werte variierten jedoch sehr stark zwischen den verschiedenen gemessenen Klonen. In der exponentiellen Wachstumsphase lagen die gemessenen spezifischen Aktivitäten zwischen 0,010 und 0,080 U/mg (Abb. 15B). Der berechnete Mittelwert lag bei 0,057 U/mg. Im weiteren Wachstumsverlauf stiegen die Werte für die spezifischen Aktivitäten bis zur stationären Wachstumsphase auf 0,176 bis 0,603 U/mg an. Der Mittelwert für die stationären Aktivitäten betrug 0,435 U/mg. Wie in Abbildung 15B ersichtlich ist, lagen die Werte für die Standardabweichungen bei den *mcA/DEFG<sup>ex</sup>*-Transformanten außergewöhnlich hoch und erreichten bis zu 78% der durchschnittlich gemessenen Aktivitäten. Die *mcA*-Promotoraktivität wurde in den *mcA/DEFG<sup>ex</sup>*-Transformanten im Durchschnitt um das 83-fache, verglichen mit den *mcA*-Transformanten, aktiviert. Dies entsprach sehr genau der nicht reduzierten Aktivierung in den *mcA/E<sup>ex</sup>*- bzw. *mcA/DE<sup>ex</sup>*-Transformanten.

Dieses Ergebnis war unerwartet, da mit der mcA/DEF<sup>ex</sup>-Transformante bereits eine Reduktion der mcA-Promotoraktivität gemessen werden konnte und die mcA/DEFG<sup>ex</sup>-Transformante ebenfalls *gvpDEF* enthielt. Für den besseren Vergleich der Aktivitäten der einzelnen *Hf. volcanii*-Transformanten wurden die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten innerhalb vier Phasen während des Wachstums gemittelt und in einem Säulendiagramm dargestellt (Abb. 16B). Die Phase 20-40 h umfasst den späten exponentiellen Bereich, Phase 45-65 h stellt den Übergang von exponentieller zu stationärer Wachstumsphase dar und die Phasen 70-85 h und 95-115 h umfassen die frühe und späte stationäre Wachstumsphase (Abb. 16).

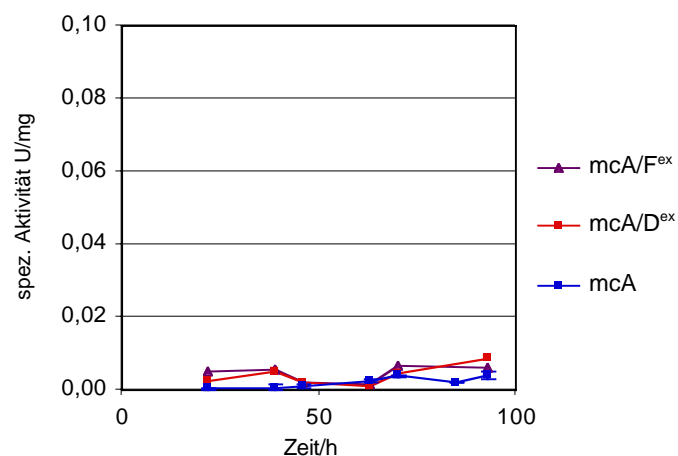


**Abb. 16.** Typische Wachstumskurve von *Hf. volcanii*-Transformanten und gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Transformanten mit den Reportergenkonstrukten mcA, mcA/E<sup>ex</sup>, mcA/DE<sup>ex</sup>, mcA/DEF<sup>ex</sup> und mcA/DEFG<sup>ex</sup> (siehe auch Tabelle 5). Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten wurden innerhalb vier Phasen (20-40 h, 45-65 h, 70-85 h und 95-115 h) während des Wachstums der Transformanten gemittelt und vergleichend dargestellt.



Während die Transformanten  $mcA/E^{ex}$ ,  $mcA/DE^{ex}$  und  $mcA/DEFG^{ex}$  vergleichbare hohe  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten zeigten, war die Aktivität der  $mcA/DEF^{ex}$ -Transformante erniedrigt. Die Reduktion erreichte aber nicht die niedrigen Aktivitäten der  $mcA$ -Transformante.

Da in den beschriebenen Transformanten eine Reduktion der  $mcA$ -Promotoraktivität durch die Anwesenheit von  $gvpD$  und  $gvpF$  zusätzlich zu  $gvpE$  gezeigt werden konnte, sollte weiter untersucht werden, ob die reduzierende Wirkung von  $gvpD$  und  $gvpF$  auch in  $mcA/D^{ex}$ - und  $mcA/F^{ex}$ -Transformanten gemessen werden konnte, die das  $mcA-bgaH$ -Konstrukt und den Leserahmen von  $gvpD$  bzw.  $gvpF$  in pJAS35 enthielten. Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Transformanten mit  $mcA/D^{ex}$  und  $mcA/F^{ex}$  war während dem gesamten Wachstum sehr niedrig, aber nicht niedriger als die basale Aktivität der  $mcA$ -Transformante (Abb. 17). Sowohl die  $mcA/D^{ex}$ - und  $mcA/F^{ex}$ -Transformanten, als auch die  $mcA$ -Transformante wiesen spezifische Aktivitäten im Bereich bis zu 0,0052 U/mg in der exponentiellen Wachstumsphase und bis zu 0,0089 U/mg in der stationären Wachstumsphase auf. Eine Reduktion der  $mcA$ -Promotoraktivität durch die zusätzliche Expression von  $gvpD$  oder  $gvpF$  konnte in diesen Experimenten nicht gezeigt werden.



**Abb. 17.** Aktivitätskurven der *Hf. volcanii*-Transformanten mit den Reportergenkonstrukten  $mcA$ ,  $mcA/D^{ex}$  und  $mcA/F^{ex}$  (siehe auch Tabelle 5). Die spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten wurden während des Wachstums der Transformanten mit dem ONPG-Test ermittelt.

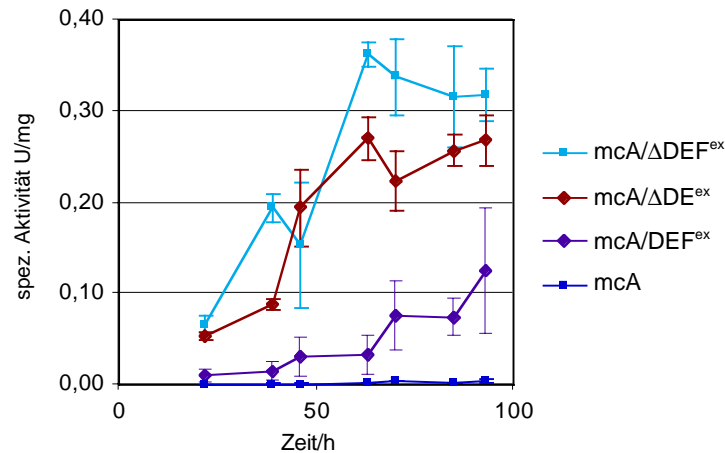
Da in den  $mcA/DEF^{ex}$ -Transformanten eine Reduktion der GvpE-vermittelten aktivierten  $mcA$ -Promotoraktivität gezeigt werden konnte, wurde in weiteren Analysen untersucht, ob GvpF auch alleine in der Lage ist, die Aktivierung der Transkription durch GvpE am  $mcA$ -Promotor zu reduzieren. Für diese Analysen wurden Transformanten von *Hf. volcanii* verwendet, die eine Variation des  $DEF^{ex}$ -Konstrukts mit einer 918 bp-Deletion des Leserahmens von  $gvpD$  enthielten ( $\Delta DEF^{ex}$ -Konstrukt, Abb. 14). Für den Vergleich mit Transformanten,

die eine durch GvpE aktivierte maximale Promotoraktivität zeigen, wurde hier nicht die  $mcA/E^{ex}$ -Transformante verwendet, sondern die Transformante  $mcA/\Delta DE^{ex}$ . Das  $\Delta DE^{ex}$ -Konstrukt ist eine Variante des  $DE^{ex}$ -Konstrukts, bei dem der Leserahmen von *gvpD* die gleiche 918 bp-Deletion wie in dem  $\Delta DEF^{ex}$ -Konstrukt enthält (Abb. 14). Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der  $mcA/\Delta DE^{ex}$ -Transformante war bereits in der exponentiellen Wachstumsphase sehr hoch und betrug im Durchschnitt 0,0531 U/mg (Abb. 18). Im Verlauf des Wachstums stieg die Aktivität bis zum Eintritt in die stationäre Wachstumsphase stark an und erreichte im Durchschnitt einen Höchstwert von 0,2705 U/mg, der im weiteren Verlauf des Wachstums in der stationären Wachstumsphase relativ konstant blieb. Der steile Anstieg der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten in der exponentiellen Wachstumsphase führte zu einem Faktor von durchschnittlich 180 für die Aktivierung des  $mcA$ -Promotors. In der stationären Wachstumsphase betrug der Faktor dagegen nur noch 65. Vergleicht man den Verlauf der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der  $mcA/E^{ex}$ -Transformante mit dem der  $mcA/\Delta DE^{ex}$ -Transformante (Abb. 15 und Abb. 18), so fällt der unterschiedliche Kurvenverlauf auf. Während die Aktivitätskurve der  $mcA/E^{ex}$ -Transformante konstant linear während des gesamten Wachstums stieg, zeigte die Aktivitätskurve der  $mcA/\Delta DE^{ex}$ -Transformante nach einem linearen Anstieg bis zum Eintritt in die stationäre Wachstumsphase eine Sättigung im stationären Bereich.

Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der  $mcA/\Delta DEF^{ex}$ -Transformante betrug in der exponentiellen Wachstumsphase im Durchschnitt 0,0660 U/mg (Abb. 18). Im weiteren Verlauf des Wachstums stiegen die Aktivitäten bis zu einem Höchstwert von 0,3634 U/mg. Der Kurvenverlauf der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten war ähnlich dem der  $mcA/\Delta DE^{ex}$ -Transformante, lag im Einzelnen sogar etwas höher. In der exponentiellen Wachstumsphase war eine 230-fach stärkere Aktivität meßbar als in der  $mcA$ -Transformante, in der stationären Wachstumsphase betrug der Faktor der Aktivierung 87. Mit den  $mcA/\Delta DEF^{ex}$ -Transformanten konnten somit nicht die niedrigen Aktivitäten wie mit den  $mcA/DEF^{ex}$ -Transformanten gemessen werden.

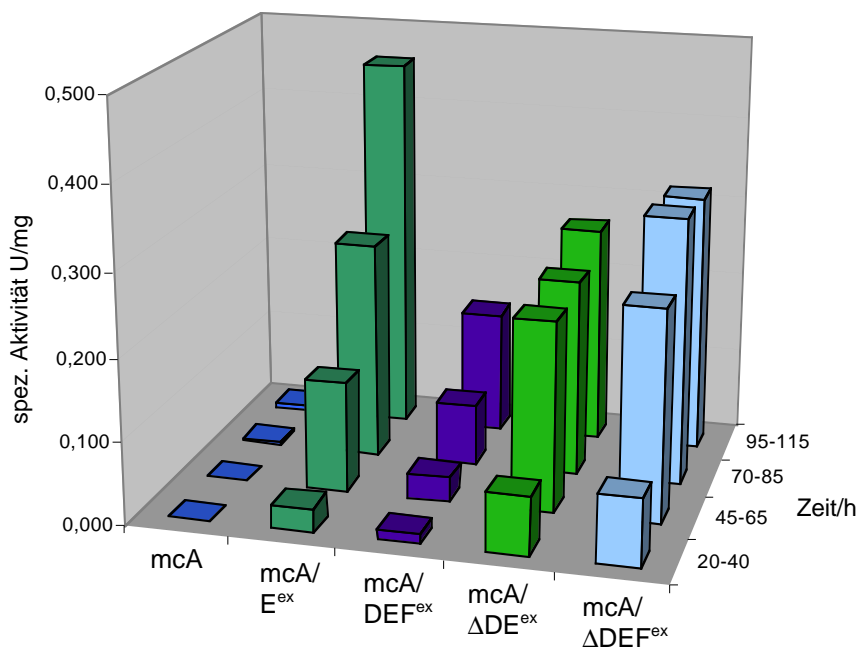
Daraus kann man den Schluß ziehen, dass GvpF alleine nicht in der Lage ist, die GvpE-vermittelte Aktivierung des  $mcA$ -Promotors negativ zu beeinflussen, GvpD aber sehr wohl den  $mcA$ -Promotor bzw. die GvpE-vermittelte Aktivierung des  $mcA$ -Promotors negativ beeinflusst, wie die Northern-Analysen der  $\Delta DE/D^{ex}$ -Transformanten mit der A-Sonde zeigten.

Die Ergebnisse der Reporteranalysen mit dem *bgaH*-Gen zeigten jedoch, dass eine Reduktion der GvpE-vermittelten aktivierten *mcA*-Promotoraktivität nur bei gleichzeitiger Anwesenheit der *gvpD*- und *gvpF*-Gene messbar war.



**Abb. 18.** Aktivitätskurven der *Hf. volcanii*-Transformanten mit den Reportergenkonstrukten *mcA*, *mcA/DEF<sup>ex</sup>*, *mcA/ΔDE<sup>ex</sup>* und *mcA/ΔDEF<sup>ex</sup>* (siehe auch Tabelle 5). Die spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten wurden während des Wachstums der Transformanten mit dem ONPG-Test ermittelt. In dem Diagramm sind Mittelwerte der zu vergleichbaren Zeitpunkten gemessenen Aktivitäten von mindestens drei Klonen dargestellt. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken eingezeichnet.

Für einen besseren Vergleich der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der eben beschriebenen *Hf. volcanii*-Transformanten wurden diese wieder innerhalb von vier Phasen (20-40 h, 45-65 h, 70-85 h und 95-115 h) während des Wachstums gemittelt und in einem Säulendiagramm dargestellt (Abb. 19). Hier fällt besonders der Verlauf der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Transformanten *mcA/ΔDE<sup>ex</sup>* und *mcA/ΔDEF<sup>ex</sup>* im Vergleich zu der Transformante *mcA/E<sup>ex</sup>* auf, der im Gegensatz zu dem linearen Anstieg der letztgenannten Transformante als Sättigungskurve verlief. Ebenso kann man hier gut erkennen, dass die *mcA/ΔDEF<sup>ex</sup>*-Transformante nicht die niedrigen Aktivitäten der *mcA/DEF<sup>ex</sup>*-Transformante aufwies, sondern gleich hohe Werte wie die *mcA/ΔDE<sup>ex</sup>*-Transformante lieferte.



**Abb. 19.** Gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der *Hf. volcanii*-Transformanten mit den Reporter-genkonstrukten mcA, mcA/E<sup>ex</sup>, mcA/DEF<sup>ex</sup>, mcA/ΔDE<sup>ex</sup> und mcA/ΔDEF<sup>ex</sup> (siehe auch Tabelle 5). Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten wurden innerhalb vier Phasen (20-40 h, 45-65 h, 70-85 h und 95-115 h) während des Wachstums der Transformanten gemittelt und vergleichend dargestellt.

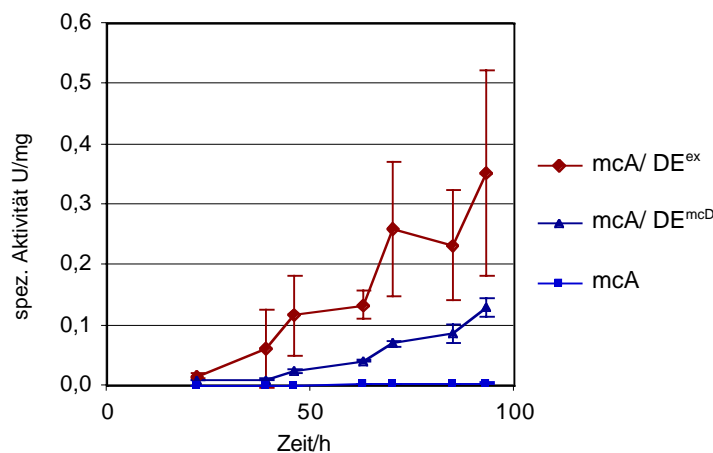
Die bisher untersuchten Kandidatengene für die Regulation der mcA-Promotoraktivität wurden jeweils in dem halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35 unter der Kontrolle des starken Ferredoxin-Promotors inseriert. Die Verwendung des pJAS35-Vektors garantiert für eine hohe Expression des entsprechend inserierten Leserahmens, und die Regulation des mcA-Promotors kann unabhängig von der Regulation des mcD-Promotors analysiert werden. Dadurch wurde verhindert, dass die entsprechenden Leserahmen aus dem D-G-Bereich indirekt über den mcD-Promotor und damit über die Verfügbarkeit der entsprechenden Proteine der vom mcD-Promotor kontrollierten Leserahmen ihre Wirkung auf den mcA-Promotor ausübten.

Die Ergebnisse zeigten, dass die gleichzeitige Anwesenheit von *gvpD* und *gvpF* in dem pJAS35-Konstrukt DEF<sup>ex</sup> zu einer verminderten GvpE-vermittelten Aktivierung des mcA-Promotors führte. Die zusätzliche Anwesenheit von *gvpD* oder *gvpF* in DE<sup>ex</sup> und ΔDEF<sup>ex</sup> zeigte dagegen keine Verminderung der Aktivierung durch GvpE.

#### 4.2. Regulation des mcA-Promotors durch GvpD, GvpE und GvpF: Expression der Gene unter der Kontrolle des mcD-Promotors

Wie bereits angedeutet, könnte auch der mcD-Promotor bzw. dessen Regulation wichtig für die Regulation der Aktivität des mcA-Promotors sein, da die Leserahmen der beiden Regulatoren GvpD und GvpE unter der Kontrolle des mcD-Promotors stehen. Aus diesem Grund wurde die Regulation des mcA-Promotors durch *gvpDEF* unter der Kontrolle des mcD-Promotors analysiert.

Für diese Untersuchungen wurden *Hf. volcanii*-Transformanten hergestellt, die zusätzlich zu dem mcA-*bgaH*-Konstrukt das DE<sup>mcD</sup>-Konstrukt (Tabelle 5, Abb. 14) in dem halobakteriellen Shuttle-Vektor pMDS20 enthielten. Die Analyse der mcA/DE<sup>mcD</sup>-Transformante lieferte in der exponentiellen Wachstumsphase spezifische Aktivitäten von im Schnitt 0,0095 U/mg (Abb. 20). Im weiteren Wachstumsverlauf stiegen die spezifischen Aktivitäten linear bis zur stationären Wachstumsphase auf einen Wert von 0,1295 U/mg an. Im Durchschnitt wurde die mcA-Promotoraktivität während des gesamten Wachstums konstant um das 27-fache aktiviert. Im Vergleich mit der mcA/DE<sup>ex</sup>-Transformante war hier eine dreifach erniedrigte spezifische Aktivität messbar (Abb. 20).



**Abb. 20.** Aktivitätskurven der *Hf. volcanii*-Transformanten mit den Reportergenkonstrukten mcA, mcA/DE<sup>mcD</sup> und mcA/DE<sup>ex</sup> (siehe auch Tabelle 5). Die spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten wurden während des Wachstums der entsprechenden Transformanten mit dem ONPG-Test ermittelt. In dem Diagramm sind Mittelwerte der zu vergleichbaren Zeitpunkten gemessenen Aktivitäten von mindestens drei Klonen dargestellt. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken eingezeichnet.

Diese erniedrigte Aktivität in der mcA/DE<sup>mcD</sup>-Transformante zeigte, dass sich die Wirkung von *gvpDE* unter der Kontrolle des mcD-Promotors von derjenigen unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors unterschied und deutete an, dass die Art der Expression des DE-Konstrukts eine Rolle für die Regulation des mcA-Promotors spielt. Der mcD-Promotor wird ebenfalls von GvpD und GvpE reguliert, die so ihre eigene Produktion autoregulieren. Aus diesem

Grund war es besonders wichtig, die Regulation des *mcA*-Promotors durch *gvpDEF* auch unter der Kontrolle des *mcD*-Promotors zu untersuchen. Weiterhin war in dem  $DE^{mcD}$ -Konstrukt die DNA-Sequenz vorhanden, die für den mRNA-*leader* von *gvpD* kodierte. Dieser mRNA-*leader* könnte für die Mengen der verschiedenen *gvpDEF*-mRNA's und damit für die Mengen an GvpD und GvpE verantwortlich sein und daher indirekt auch zur Regulation des *mcA*-Promotors beitragen.

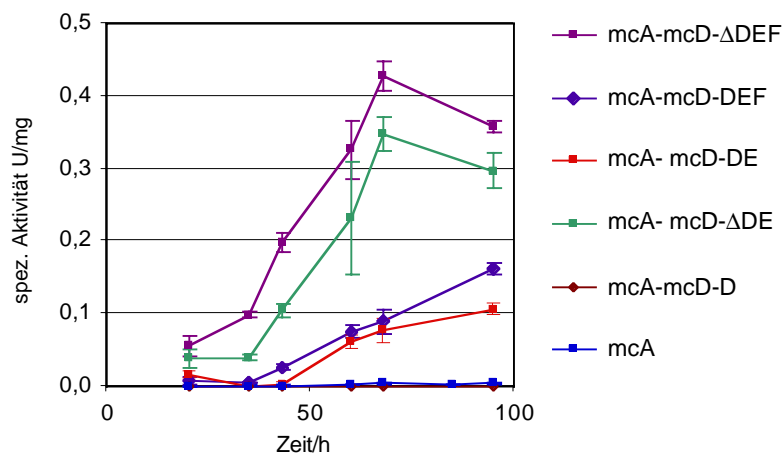
Es wurden daher in einer zweiten Serie Transformanten hergestellt, die jeweils nur ein einziges Konstrukt mit *mcA-bgaH* und verschiedenen Kombinationen der *gvp*-Gene *gvpD*, *gvpE* und *gvpF* unter der Kontrolle des *mcD*-Promotors enthielten (Tabelle 5, Abb. 14). Diese Konstrukte enthielten die vollständige Region mit den beiden *mc*-vac-Promotoren *mcA* und *mcD* sowie die Region, die für den mRNA-*leader* von *gvpD* kodiert. Die Fusion des *bgaH*-Leserahmens mit dem *mcA*-Promotor war identisch mit der des *mcA-bgaH*-Konstruktes.

Die Analyse der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten in der *mcA-mcD-D*-Transformante zeigte, dass in dieser zu keinem Zeitpunkt eine messbare Aktivität vorhanden war. Da bereits die *mcA*-Transformante sehr niedrige bis kaum nachweisbare Aktivitäten in der exponentiellen Wachstumsphase und niedrige Aktivitäten bis zu maximal 0,0088 U/mg in der stationären Wachstumsphase (vgl. Abb. 15 und Abb. 21) aufwies, war der Unterschied zu der *mcA-mcD-D*-Transformante nur sehr gering. Dass es sich trotzdem um eine signifikante Reduktion der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten in der *mcA-mcD-D*-Transformante handelte, wurde durch die Beobachtung untermauert, dass sich die Reaktionsansätze im ONPG-Test bei einer sehr langen Inkubation über Nacht bei der *mcA*-Transformante durch die Akkumulation des o-Nitrophenolat-Anions gelblich verfärbten, während die Reaktionsansätze der entsprechenden *mcA-mcD-D*-Transformante auch nach Inkubation über Nacht farblos blieben. Dieses Ergebnis deutete an, dass GvpD alleine in der Lage war, die basale *mcA*-Promotoraktivität zu erniedrigen und gab einen Hinweis auf eine Wirkung von GvpD direkt am *mcA*-Promotor.

Das *mcA-mcD-ΔDE*-Konstrukt enthielt als funktionellen Leserahmen neben *bgaH* nur *gvpE*. Der Leserahmen von *gvpD* enthielt hier die bereits beschriebene 918 bp-*XhoI*-Deletion. Da für die Aktivierung außer GvpE keine weiteren Gvp-Proteine nötig sind, stellte die *mcA-mcD-ΔDE*-Transformante in dieser Serie die Transformante mit der uneingeschränkt aktivierten Promotoraktivität (100%) dar. Bereits in der exponentiellen Wachstumsphase betrug die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im Durchschnitt 0,0389 U/mg und stieg bis zur stationären Wachstumsphase linear bis zu einem Wert von 0,3486 U/mg an (Abb. 21). Der Faktor für die Aktivierung der *mcA*-Promotoraktivität durch GvpE in der *mcA-mcD-ΔDE*-Transformante war von der exponentiellen bis zur stationären Wachstumsphase relativ kon-

stant und betrug im Durchschnitt das 96-fache der spezifischen Aktivität der mcA-Transformante.

Die mcA-mcD-DE-Transformante zeigte im Vergleich mit der mcA-mcD- $\Delta$ DE-Transformante deutlich niedrigere Werte während des gesamten Wachstums. In der exponentiellen Wachstumsphase lagen die Werte für die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im Durchschnitt bei 0,0150 U/mg und stiegen bis zur stationären Wachstumsphase bis zu einem Durchschnittswert von 0,1068 U/mg an (Abb. 21). Der Faktor für die Aktivierung der mcA-Promotoraktivität betrug in der mcA-mcD-DE-Transformante im Durchschnitt das 26-fache der spezifischen Aktivität der mcA-Transformante. Damit war durch die zusätzliche Anwesenheit von *gvpD* die Aktivierung um das 3,7-fache niedriger als in der Transformante mit dem mcA-mcD- $\Delta$ DE-Konstrukt.



**Abb. 21.** Aktivitätskurven der *Hf. volcanii*-Transformanten mit den Reportergenkonstrukten mcA, mcA-mcD-D, mcA-mcD- $\Delta$ DE, mcA-mcD-DE, mcA-mcD-DEF und mcA-mcD- $\Delta$ DEF (siehe auch Tabelle 5). Die spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten wurden während des Wachstums der entsprechenden Transformanten mit dem ONPG-Test ermittelt. In dem Diagramm sind Mittelwerte der zu vergleichbaren Zeitpunkten gemessenen Aktivitäten von mindestens drei Klonen dargestellt. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken eingezeichnet.

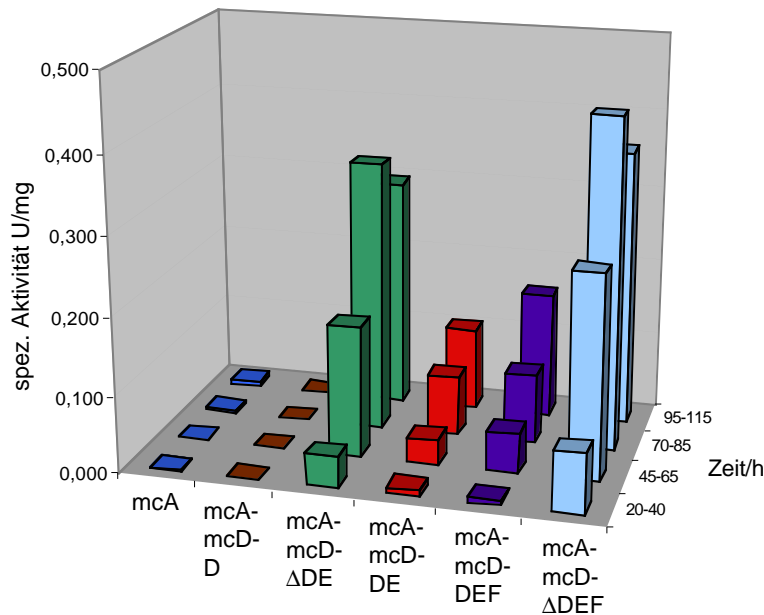
Transformanten von *Hf. volcanii*, die das mcA-mcD-DEF-Konstrukt trugen, zeigten ähnliche Aktivitäten wie die mcA-mcD-DE-Transformante. Die spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten erreichten im Durchschnitt in der exponentiellen Wachstumsphase Werte um 0,0080 U/mg und stiegen bis zur stationären Wachstumsphase konstant bis 0,1618 U/mg an. Die daraus berechnete Aktivierung des mcA-Promotors betrug im Durchschnitt den Faktor 27 bezogen auf die mcA-Transformanten. Im Vergleich mit der mcA-mcD- $\Delta$ DE-Transformante war die 3,6-fach erniedrigte Aktivierung in der mcA-mcD-DEF-Transformante ähnlich wie in der mcA-mcD-DE-Transformante. Die zusätzliche Anwesenheit des *gvpF*-Leserahmens hatte in diesem Versuchsansatz keine weitere Erniedrigung der Aktivierung der mcA-Promotoraktivität zur Folge. Allerdings begannen in allen Versuchsreihen die Messungen der

spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten zu Zeitpunkten (ab 20 h), bei denen die Produktion von GvpF unter natürlichen Bedingungen bereits sehr gering ist (vgl. Abb. 12, Western-Analyse mit GvpF: Zeitpunkte 4-7).

Die mcA-mcD- $\Delta$ DEF-Transformante enthielt neben *bgaH* nur die funktionellen Leserahmen von *gvpE* und *gvpF* und hatte aufgrund des Fehlens von GvpD entsprechend hohe Aktivitäten. Die spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten betrugen im Durchschnitt 0,0555 U/mg in der exponentiellen und 0,3585 U/mg in der stationären Wachstumsphase. Der Faktor für die Aktivierung der mcA-Promotoraktivität betrug in dieser Transformante das 134-fache der mcA-Transformante und war dadurch sogar höher als in der mcA-mcD- $\Delta$ DE-Transformante. Mit der mcA-mcD- $\Delta$ DEF-Transformante wurde ebenso wie mit der mcA-mcD- $\Delta$ DE-Transformante höhere  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten als mit der mcA-mcD-DE-Transformante gemessen. Diese Ergebnisse zeigten, dass das Fehlen von GvpD für die hohen Aktivitäten des mcA-Promotors verantwortlich war. Das zusätzliche Vorhandensein des *gvpF*-Leserahmens hatte in der mcA-mcD- $\Delta$ DEF-Transformante keine negative Auswirkung auf die vom mcA-Promotor aus gemessene  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität.

Für den besseren Vergleich der einzelnen *Hf. volcanii*-Transformanten wurden die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten wieder innerhalb vier Phasen (20-40 h, 45-65 h, 70-85 h und 95-115 h) während des Wachstums gemittelt und in einem Säulendiagramm dargestellt (Abb. 22). Im wesentlichen lassen sich die Aktivitätsverläufe in drei Kategorien unterteilen: Während die Transformanten mcA und mcA-mcD-D sehr niedrige bzw. nicht nachweisbare Aktivitäten aufwiesen, erreichten die Transformanten mcA-mcD- $\Delta$ DE und mcA-mcD- $\Delta$ DEF sehr hohe Aktivitäten aufgrund der Aktivierung des mcA-Promotors durch GvpE. Die dritte Kategorie stellen die Transformanten mcA-mcD-DE und mcA-mcD-DEF dar, deren Aktivitäten über das gesamte Wachstum hinweg um das drei- bis vierfache erniedrigt gegenüber den maximal erreichten Aktivitäten waren.



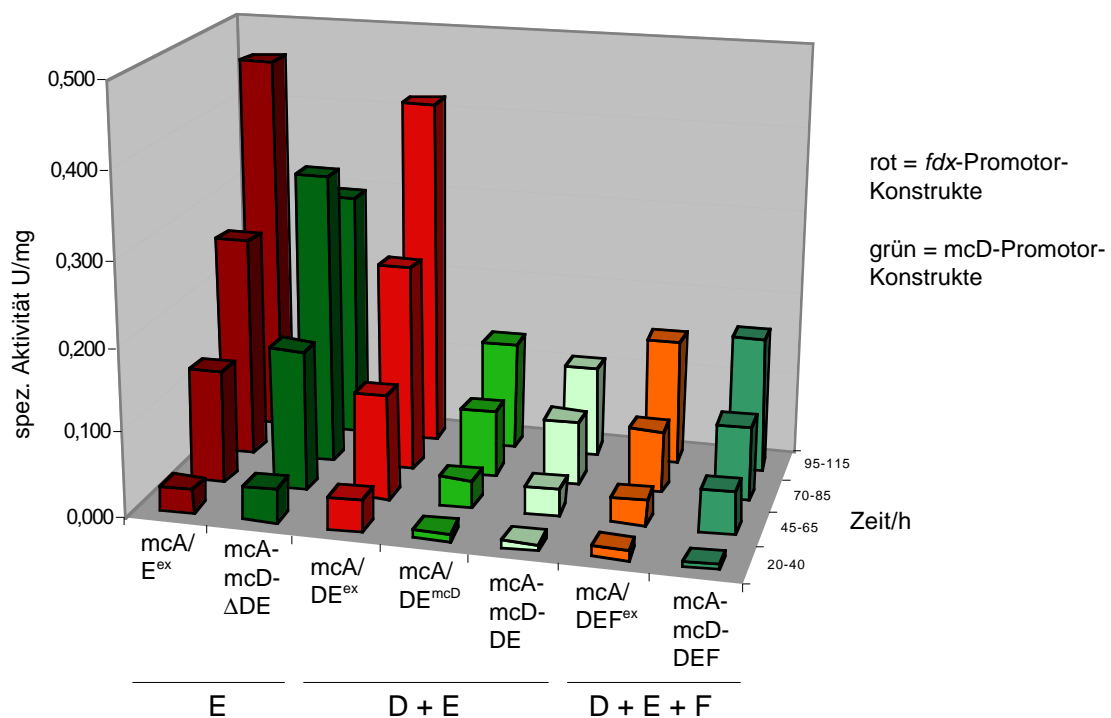


**Abb. 22.** Gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der *Hf. volcanii*-Transformanten mit den Reporter-genkonstrukten mcA, mcA-mcD-D, mcA-mcD- $\Delta$ DE, mcA-mcD-DE, mcA-mcD-DEF und mcA-mcD- $\Delta$ DEF (siehe auch Tabelle 5). Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten wurden innerhalb vier Phasen (20-40 h, 45-65 h, 70-85 h und 95-115 h) während des Wachstums der Transformanten gemittelt und vergleichend dargestellt.

In Abb. 23 ist abschließend ein Vergleich der spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten von Transformanten mit *fdx*-Promotor-Konstrukten und mcD-Promotor-Konstrukten dargestellt. Die hier beschriebenen Ergebnisse der Reporteranalysen lassen folgende Schlussfolgerungen zu:

- 1.) Die Aktivierung des mcA-Promotors durch GvpE war in der mcA-mcD- $\Delta$ DE-Transformante, die *gvpE* unter der Kontrolle des mcD-Promotors exprimierte, vergleichbar hoch wie in der mcA/ $E^{ex}$ -Transformante, bei der *gvpE* unter der Kontrolle des starken *fdx*-Promotors stand. Nur in der späten stationären Wachstumsphase erreichten die spezifischen Aktivitäten in der mcA/ $E^{ex}$ -Transformante 1,5-fach höhere Werte als in der mcA-mcD- $\Delta$ DE-Transformante.
- 2.) Die zusätzliche Expression von *gvpD* unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors hatte in der mcA/ $DE^{ex}$ -Transformante keine messbare Auswirkung auf die mcA-Promotoraktivität. Die spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten waren vergleichbar hoch wie in der mcA/ $E^{ex}$ -Transformante. Die zusätzliche Expression von *gvpD* unter der Kontrolle des eigenen mcD-Promotors und bei Vorhandensein der kodierenden Sequenz für den mRNA-*leader* von *gvpD* führte hingegen sowohl in der mcA/ $DE^{mcD}$ - als auch in der mcA-mcD-DE-Transformante zu einer 3,6-fach erniedrigten Aktivierung des mcA-Promotors.

3.) Die zusätzliche Anwesenheit von *gvpF* führte in der *mcA/DEF<sup>ex</sup>*-Transformante zu einer 3,3-fach erniedrigten Aktivierung des *mcA*-Promotors. In der *mcA-mcD-DEF*-Transformante, bei der *gvpF*, wie auch *gvpDE* unter der Kontrolle des *mcD*-Promotors standen, war dagegen eine ähnlich hohe  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wie in der *mcA-mcD-DE*-Transformante messbar. Die bereits erniedrigten Aktivitäten der letztgenannten Transformante ließen sich durch die zusätzliche Anwesenheit von *gvpF* nicht weiter reduzieren. Diese Ergebnisse deuten an, dass die regulatorische Bedeutung von GvpF davon abhing, ob *gvpF* unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors oder des *mcD*-Promotors exprimiert wurde. Daher wurde in weiteren Analysen untersucht, welchen Einfluss die unterschiedliche Expression der verschiedenen Konstrukte auf die mRNA- und die Proteinmenge hat.



**Abb. 23.** Vergleich der spezifischen Aktivitäten zwischen Transformanten, deren *gvpDEF*-Leserahmen unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors stehen und Transformanten mit *gvpDEF* unter der Kontrolle des eigenen *mcD*-Promotors. Gemittelte spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten von *Hf. volcanii*-Transformanten mit den Reportergenkonstrukten *mcA/E<sup>ex</sup>*, *mcA-mcD-ΔDE*, *mcA/DE<sup>ex</sup>*, *mcA/DE<sup>mcD</sup>*, *mcA-mcD-DE*, *mcA/DEF<sup>ex</sup>* und *mcA-mcD-DEF* (siehe auch Tabelle 5). Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten wurden innerhalb vier Phasen (20-40 h, 45-65 h, 70-85 h und 95-115 h) während des Wachstums der Transformanten gemittelt.

#### 4.3. Nachweis der Expression der *gvp*-Gene in den Transformanten auf Transkriptions- und Translationsebene

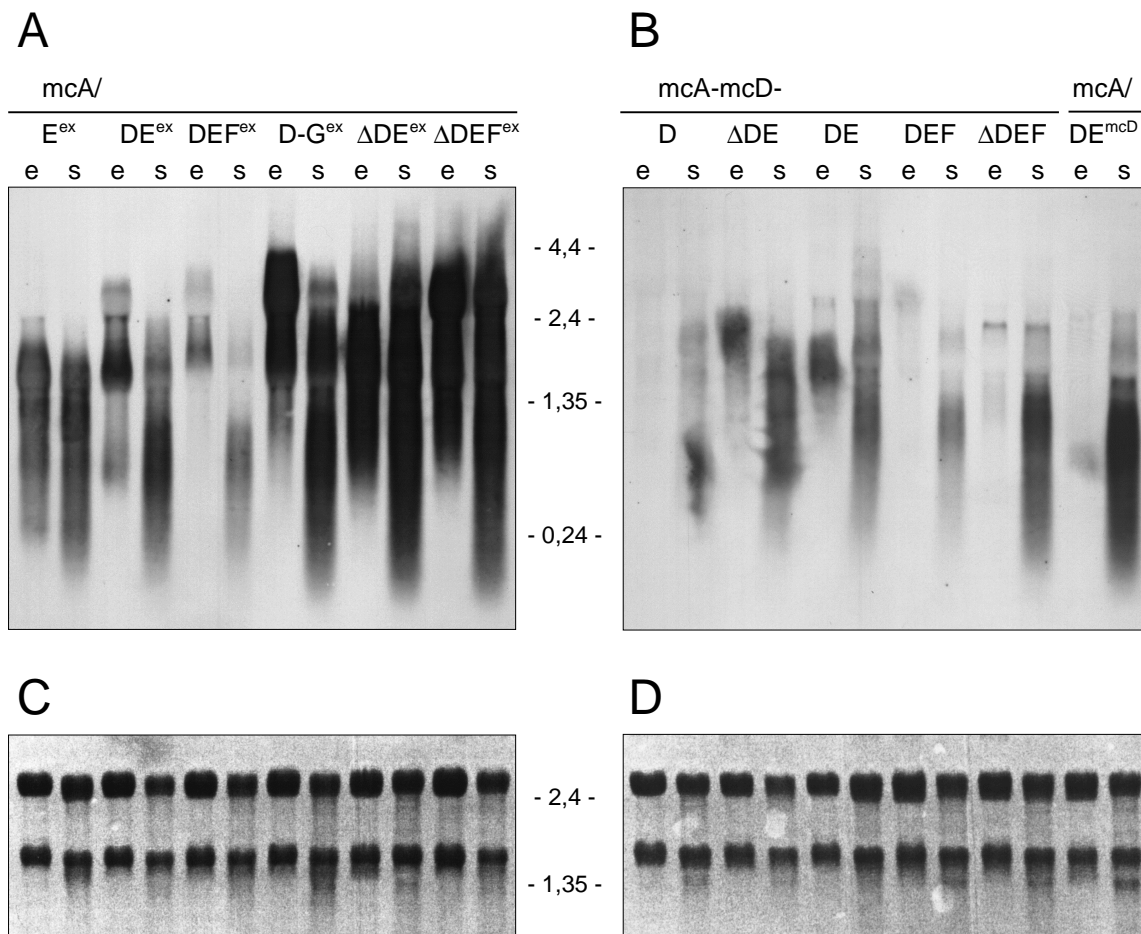
Die Expression der *gvp*-Leserahmen in den Konstrukten, die für die Reportergenanalysen Verwendung fanden, wurde mittels Northern-Analysen mit einer strangspezifischen RNA-

Sonde untersucht, die den 3'-Bereich von *gvpD* und den größten Teil von *gvpE* überstreicht (D/E-Sonde, Abb. 14). Zusätzlich wurden mittels Western-Analysen mit den Antiseren, die spezifisch mit GvpD, GvpE und GvpF reagieren, die Bildung dieser Proteine untersucht. Die Analyse der Bildung von GvpD, GvpE und GvpF in *Hf. mediterranei* zeigte bereits, dass die Nachweisbarkeit dieser Proteine während des Wachstums sehr unterschiedlich war (Abb. 12). Während GvpD und GvpE erst während des stationären Wachstums nachweisbar waren (40-80 h, bzw. 15-80 h), wurde GvpF sehr früh gebildet (5-15 h).

#### 4.3.1. Northern-Analysen zum Nachweis der Expression auf RNA-Ebene

Der Nachweis der *gvp*-Transkripte erfolgte mit der D/E-Sonde (Abb. 14). Die Expression der *gvpDEF*-Gene unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors führte zu großen Mengen der entsprechenden Transkripte in den *mcA/E<sup>ex</sup>*-, *mcA/DEFG<sup>ex</sup>*-, *mcA/ΔDE<sup>ex</sup>*- und *mcA/ΔDEF<sup>ex</sup>*-Transformanten (Abb. 24A). Die jeweils größten Transkripte überstrichen die Leserahmen aller in den Konstrukten vorhandener *gvp*-Gene sowohl in der exponentiellen ( $OD_{600} = 0,2-0,3$ ) als auch in der stationären ( $OD_{600} > 2$ ) Wachstumsphase. Die Transkriptgrößen variierten bei den einzelnen Transformanten entsprechend der Konstruktgrößen der *gvp*-Gene und den z. T. vorhandenen 918 bp-Deletionen im Leserahmen von *gvpD*. Zusätzlich waren noch große Mengen kürzerer RNA-Fragmente nachweisbar, die nicht mehr die Information für einen vollständigen Leserahmen enthielten und vermutlich Abbruch- oder Abbauprodukte waren. Bei der *mcA/D-G<sup>ex</sup>*-Transformante waren in der stationären Wachstumsphase nur geringe Mengen des über 3,2 kb großen Transkripts, das außer *gvpDEF* auch *gvpG* überstreichte, nachweisbar. In den *mcA/DE<sup>ex</sup>*- und *mcA/DEF<sup>ex</sup>*-Transformanten waren während des gesamten Wachstums nur geringe Mengen des *gvpDE*- bzw. des *gvpDEF*-Transkripts nachweisbar.

Die Expression unter der Kontrolle des *mcD*-Promotors führte allgemein zu geringeren RNA-Mengen, die spezifisch mit der D/E-Sonde hybridisierten (Abb. 24B). Die Transformanten *mcA-mcD-ΔDE*, *mcA-mcD-DE* und *mcA-mcD-ΔDEF* enthielten relativ geringe, aber nachweisbare Mengen der entsprechenden Transkripte. Bei den Transformanten *mcA-mcD-D*, *mcA-mcD-DEF* und *mcA/DE<sup>mcD</sup>* waren jedoch kaum detektierbare Mengen der entsprechenden Transkripte in der exponentiellen und auch weniger Transkripte in der stationären Wachstumsphase vorhanden.



**Abb. 24.** Northern-Analyse zum Nachweis der *gvpDE(FG)*-Transkripte in den *Hf. volcanii*-Transformanten. In jeder Spur wurden 5 µg Gesamt-RNA aufgetragen, die (e) aus der exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600} = 0,3-0,5$ ), und (s) aus der stationären Wachstumsphase ( $OD_{600} > 2$ ) isoliert wurden (A, B). Die RNA wurde mittels 1,2%igen Formaldehyd-enthaltenden Agarosegelen aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit der *gvpDE*-spezifischen RNA-Sonde (Abb. 14) hybridisiert. Die transferierte RNA wurde mit Methyleneblau angefärbt. Anhand der Schärfe der Banden der 23S rRNA und der 16S rRNA wurde die Quantität und die Qualität der transferierten RNA kontrolliert (C, D). Die Längen (in kb) des RNA-Größenstandards sind jeweils zwischen den Membranen angegeben.

#### 4.3.2. Western-Analysen zum Nachweis der Expression auf Proteinebene

Die Proteine GvpD, GvpE und GvpF wurden mittels Western-Analysen mit den jeweils entsprechenden Antiseren nachgewiesen. Die Antiseren wurden gegen die jeweiligen gereinigten His-tag-Fusionsproteine in Kaninchen generiert (Kapitel 3).

Die Western-Analyse der *Hf. volcanii*-Transformanten mit dem *GvpD*-spezifischen Antiserum zeigte, dass die *mcA/D<sup>ex</sup>*-Transformanten sehr große Mengen von GvpD sowohl in der exponentiellen als auch in der stationären Wachstumsphase produzierten (Abb. 25A), während der Nachweis von intaktem GvpD in den Transformanten mit *mcA/DE<sup>ex</sup>* deutlich geringer war. Sowohl die *mcA/DEF<sup>ex</sup>*- als auch die *mcA/DEFG<sup>ex</sup>*-Transformanten produzierten wieder größere Mengen von GvpD. Bei dem genaueren Betrachten der entsprechenden

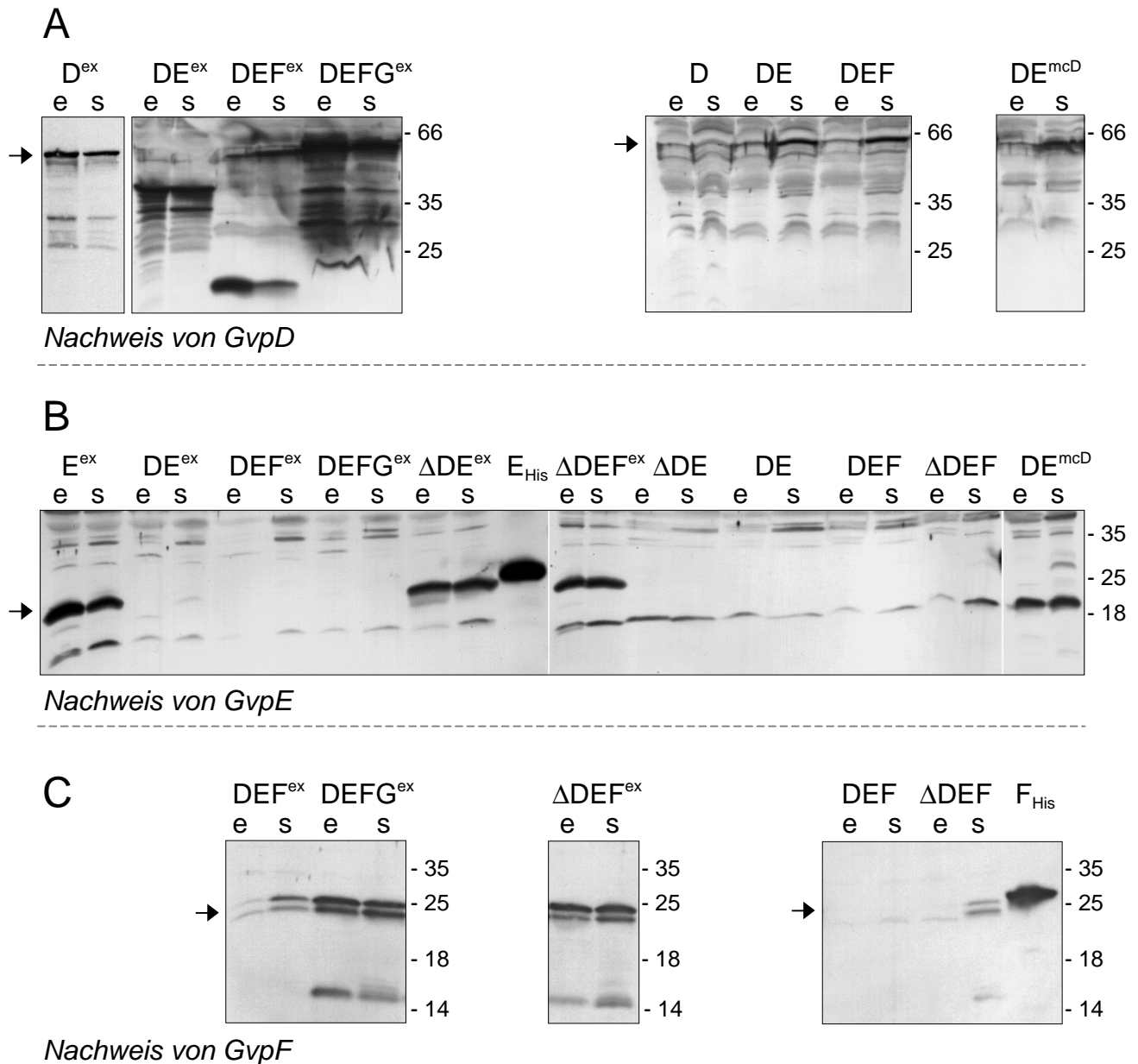
Spuren der unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors exprimierten DNA-Konstrukte fällt auf, dass es große Unterschiede in den zusätzlich zu dem Signal von GvpD (ca. 61 kDa) vorkommenden Reaktionen mit dem GvpD-Antiserum gab. So traten bei den Transformanten mcA/DE<sup>ex</sup> und mcA/DEFG<sup>ex</sup> Signale bei ca. 35 und 40 kDa auf, die in der mcA/DEF<sup>ex</sup>-Transformante nicht detektierbar waren. Umgekehrt waren in der mcA/DEF<sup>ex</sup>-Transformante Signale bei ca. 20 kDa nachweisbar, die bei keiner anderen Transformante zu sehen waren. Das differentielle Auftreten dieser Banden und das Fehlen der Banden bei den Antiserentests mit löslichen Proteinen von *Hf. volcanii* (Abb. 11A) spricht dagegen, dass es sich dabei um unspezifische Reaktionen bestimmter Proteine aus *Hf. volcanii* mit dem Antiserum handelte. Es ist vielmehr wahrscheinlicher, dass es sich dabei z. T. um Abbauprodukte von GvpD handelte, deren Größe von den jeweils verwendeten Transformanten abhing.

In den Transformanten mcA-mcD-D, -DE, -DEF und mcA/DE<sup>mcD</sup> war GvpD jeweils in beiden Wachstumsphasen nachweisbar, wobei die mcA-mcD-D-Transformante ungefähr gleiche Mengen des ca. 61 kDa großen GvpD in der exponentiellen und in der stationären Wachstumsphase, die übrigen Transformanten jedoch GvpD vorwiegend in der stationären Wachstumsphase produzierten (Abb. 25A).

Die Western-Analyse mit dem GvpE-spezifischen Antiserum zeigte große Mengen des ca. 22 kDa großen GvpE in den Transformanten mit mcA/E<sup>ex</sup>, mcA/ΔE<sup>ex</sup> und mcA/ΔDEF<sup>ex</sup> sowohl in der exponentiellen als auch in der stationären Wachstumsphase (Abb. 25B). Bei den Transformanten mcA/DE<sup>ex</sup> und mcA/DE<sup>mcD</sup> war GvpE in der exponentiellen Wachstumsphase nicht nachweisbar, wohingegen in der stationären Wachstumsphase geringe Mengen von GvpE detektierbar waren. Sowohl in den beiden Transformanten mit Konstrukten unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors mcA/DEF<sup>ex</sup> und mcA/DEFG<sup>ex</sup>, als auch in den Transformanten mit den Konstrukten mcA-mcD-ΔDE, -DE, -DEF und -ΔDEF unter der Kontrolle des mcD-Promotors war GvpE weder in der exponentiellen noch in der stationären Wachstumsphase in nachweisbaren Mengen vorhanden (Abb. 25B).

Mit dem GvpF-spezifischen Antiserum konnte in den Transformanten mcA/DEF<sup>ex</sup>, mcA/DEFG<sup>ex</sup> und mcA/ΔDEF<sup>ex</sup> GvpF als Doppelbande bei ca. 25 kDa in der exponentiellen und in der stationären Wachstumsphase nachgewiesen werden (Abb. 25C). Während in den beiden letztgenannten Transformanten die Menge an GvpF in beiden Wachstumsphasen ungefähr gleich waren, produzierten die mcA/DEF<sup>ex</sup>-Transformanten in der exponentiellen Wachstumsphase deutlich weniger GvpF. Bei der Expression der Konstrukte DEF und ΔDEF unter der Kontrolle des mcD-Promotors war die Menge von GvpF dagegen deutlich geringer, wobei in der mcA-mcD-DEF-Transformante die Menge an GvpF unter der Nachweisgrenze

war. In der mcA-mcD- $\Delta$ DEF-Transformante konnte GvpF nur in geringer Menge in der stationären Wachstumsphase detektiert werden (Abb. 25C).



**Abb. 25.** Western-Analysen zur Detektion der Proteine GvpD, GvpE und GvpF in *Hf. volcanii*-Transformanten (siehe auch Tabelle 5). In jeder Spur wurden 20  $\mu$ g lösliche Proteine mittels 15%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, die (e) aus der exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600} = 0,3-0,5$ ), und (s) aus der stationären Wachstumsphase ( $OD_{600} > 2$ ) isoliert wurden. Die Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit den entsprechenden Antiseren inkubiert, die mit GvpD (A), GvpE (B) bzw. GvpF (C) reagieren. Die molekularen Massen (in kD) der Protein-Größenstandards sind rechts angegeben. Pfeile markieren die Laufweiten der detektierten Proteine.

Die Ergebnisse der Western-Analysen der *Hf. volcanii*-Transformanten sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Bei dem Vergleich der Ergebnisse fallen einige Punkte besonders auf:

1. Während die Expression der Leserahmen von *gvpD* und *gvpE* einzeln unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors zur Bildung großer Mengen von GvpD bzw. GvpE führte, waren die Mengen beider Proteine bei gleichzeitiger Expression der Leserahmen in dem DE<sup>ex</sup>-Konstrukt deutlich geringer (Abb. 25).
2. Die Menge von GvpD, nicht aber die Menge von GvpE, war bei gleichzeitiger Expression von *gvpF* in den Transformanten mcA/DEF<sup>ex</sup> und mcA/DEFG<sup>ex</sup> erhöht (Abb. 25). Gleichzeitig war die mcA-Promotor-abhängige  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bei Anwesenheit großer Mengen von GvpF in der mcA/DEF<sup>ex</sup>-Transformante im Vergleich zur mcA/DE<sup>ex</sup>-Transformante niedriger. In den entsprechenden mcA-mcD-DEF-Transformanten war GvpF dagegen nicht nachweisbar und auch keine niedrigere  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im Vergleich mit der mcA-mcD-DE-Transformante messbar.
3. Die Deletion der 918 bp innerhalb des *gvpD*-Leserahmens in den Transformanten mcA/ $\Delta$ DE<sup>ex</sup> und mcA/ $\Delta$ DEF<sup>ex</sup> führte zu deutlich größeren Mengen an *gvpE*-mRNA und GvpE-Protein als in den entsprechenden Transformanten mcA/DE<sup>ex</sup> und mcA/DEF<sup>ex</sup>, die den *gvpD*-Leserahmen vollständig enthielten (Abb. 24 und 25).
4. Die Expression unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors führte in der mcA/E<sup>ex</sup>-Transformante zu größeren Mengen an *gvpE*-mRNA und entsprechend auch an GvpE-Protein als in der mcA-mcD- $\Delta$ DE-Transformante (Abb. 24 und 25). Die sehr großen Konzentrationsunterschiede von GvpE in diesen Transformanten resultierten jedoch nicht in entsprechend unterschiedlichen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten (Tabelle 6). Dies zeigt, dass bereits geringe, nicht nachweisbare Mengen von GvpE ausreichen, um den mcA-Promotor sehr stark zu aktivieren.

**Tabelle 6.** Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der Western-Analysen der Bildung von GvpD, GvpE und GvpF in den *Hf. volcanii*-Transformanten und gemittelte spezifische Aktivitäten\*

Transformante	GvpD		GvpE		GvpF		β-Gal-Aktivitäten (U/mg)			
	exp	stat	exp	stat	exp	stat	1	2	3	4
mcA							0,001	0,001	0,003	0,007
mcA/E <sup>ex</sup>			++	++			0,029	0,135	0,265	0,460
mcA/DE <sup>ex</sup>	+	+	-	+			0,039	0,125	0,247	0,418
mcA/DEF <sup>ex</sup>	++	++	-	-	+	+	0,012	0,031	0,075	0,150
mcA/DEFG <sup>ex</sup>	++	++	-	-	++	++	0,045	0,099	0,263	0,376
mcA/ΔDE <sup>ex</sup>			++	++			0,070	0,232	0,241	0,268
mcA/ΔDEF <sup>ex</sup>			++	++	++	++	0,081	0,258	0,327	0,318
mcA-mcD-D	+	+					<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
mcA-mcD-ΔDE			-	-			0,040	0,169	0,349	0,297
mcA-mcD-DE	+	++	-	-			0,008	0,032	0,077	0,107
mcA-mcD-DEF	+	++	-	-	-	-	0,002	0,051	0,090	0,162
mcA-mcD-ΔDEF			-	+	-	+	0,077	0,263	0,428	0,359
mcA/DE <sup>mcD</sup>	+	++	-	+			0,010	0,033	0,079	0,130

\* leere Felder bedeuten, dass entsprechende Leserahmen nicht im Konstrukt vorhanden sind; „Minus“ bedeutet, dass entsprechendes Protein nicht nachweisbar war; „+“ und „++“ bedeuten, dass die Proteine in geringen Mengen bzw. in großen Mengen vorhanden waren.

	0-0,05 U/mg
	0,05-0,2 U/mg
	>0,2 U/mg

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der Reportergenanalysen, dass bereits sehr geringe Mengen an GvpE ausreichten, um den mcA-Promotor sehr stark zu aktivieren. GvpD und GvpF wirkten zusammen negativ auf die GvpE-vermittelte Aktivierung des mcA-Promotors, wobei eine Wirkung von GvpD alleine gezeigt werden konnte, GvpF allerdings nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von GvpD eine reduzierende Wirkung auf die GvpE-vermittelte aktivierte mcA-Promotoraktivität hatte. Die gleichzeitige Expression der beiden Leserahmen von *gvpD* und *gvpE* wirkte sich negativ auf die nachweisbaren Proteinmengen von GvpD und GvpE aus. Diese Beobachtung gibt einen möglichen Hinweis auf eine direkte oder indirekte gegenseitige Beeinflussung beider Proteine.

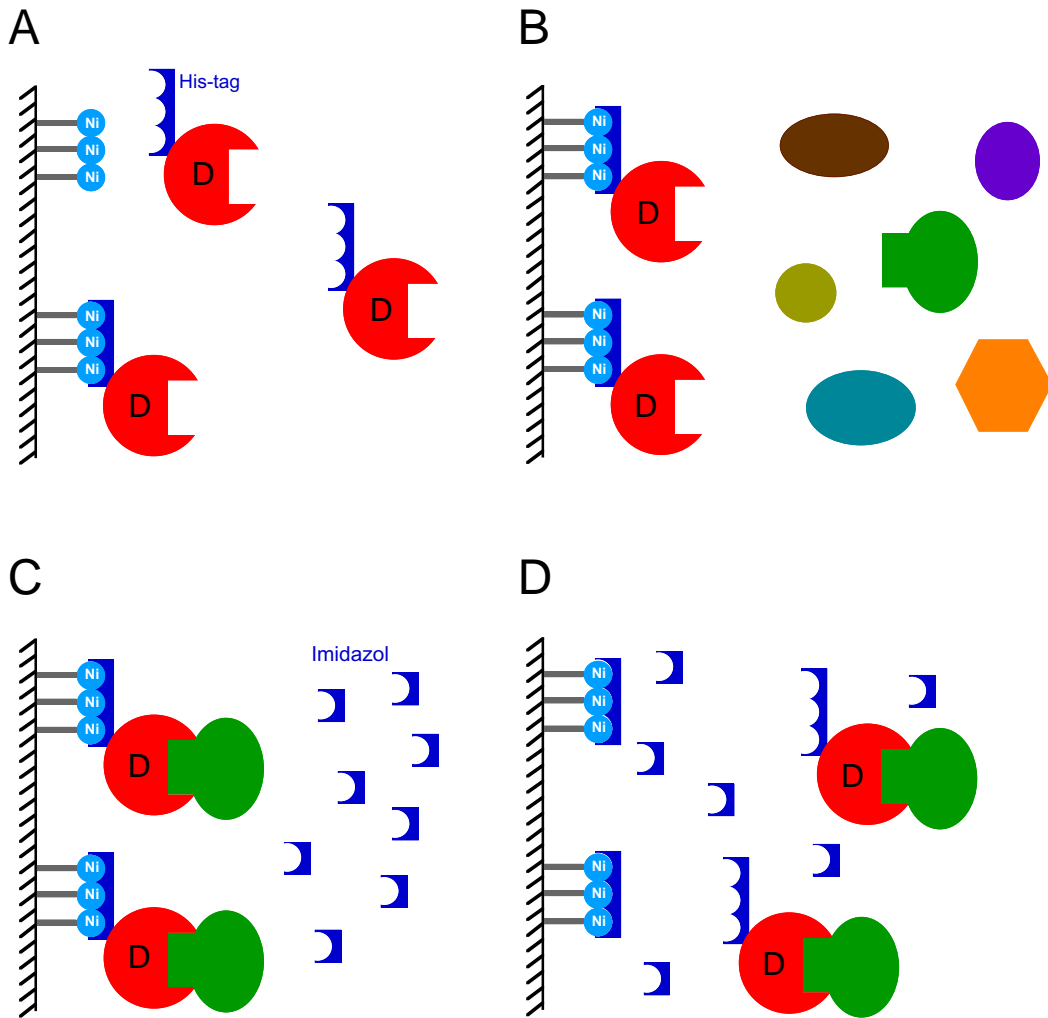


## 5. Protein-Protein-Interaktionen zwischen Gvp-Proteinen aus der G-N-Region und Proteinen aus *Hf. mediterranei*

Sowohl die Northern-Analysen, als auch die *bgaH*-Reporter-Gen-Analysen erbrachten Hinweise auf die Beteiligung bestimmter mc-vac-Gene aus dem Bereich G-N zusätzlich zu *gvpD* und *gvpE* bei der Regulation des mcA-Promotors in *Hf. mediterranei*. Für die weitere Charakterisierung der Regulation des mcA-Promotors wurden mit den entsprechenden Gvp-Proteinen *in vitro*-Analysen durchgeführt. Durch den Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen zwischen bestimmten Proteinen aus der mc-vac-Region mit den bereits identifizierten Regulatoren GvpD und GvpE sollte deren mögliche Interaktion untersucht werden.

Für diese Analysen wurden die Proteine GvpD, GvpE, GvpF, GvpG, GvpC und GvpN rekombinant in *E. coli* als His-tag-Fusionsproteine produziert und mittels Ni-NTA- bzw. Zn-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt (siehe Kapitel 3). Da die Aktivität und Stabilität von Proteinen aus halophilen Organismen in der Regel von hohen Salzkonzentrationen (2-5 M KCl oder NaCl) abhängig ist, wurden die aus *E. coli* unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff) gereinigten His-tag-Fusionsproteine schrittweise gegen Puffer dialysiert, die zu einer Konzentration von 2,5 M KCl (18,6% w/v) in den Proteinlösungen führten. Auf diesem Wege sollte eine Rückfaltung der halophilen Proteine unter nativen Bedingungen erfolgen. Für die Proteine des moderat halophilen *Hf. mediterranei* wurde dabei eine Salzkonzentration von 2,5 M KCl (18,6% w/v) gewählt. Für das Salz wurde KCl statt NaCl gewählt, da Halobakterien bekannterweise zum inneren Ausgleich der Salzkonzentration KCl anreichern (Dennis & Shimmin, 1997). Unter diesen Bedingungen wurde bereits das TATA-Bindeprotein erfolgreich rückgefaltet (Soppa & Link, 1997).

Für den Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen bestimmten Proteinen der mc-vac-Region mit löslichen Proteinen aus *Hf. mediterranei* wurden die isolierten und unter nativen Bedingungen vorliegenden His-tag-Fusionsproteine (Gvp-His) an eine Ni-NTA-Matrix gebunden, um dadurch eine Affinitätschromatographiematrix herzustellen, die ein gereinigtes Gvp-His-Fusionsprotein als koordinativ gebundenen Liganden enthält. Mit Hilfe dieser Matrix wurde versucht, Proteine aus einer Probe mit löslichen Proteinen von *Hf. mediterranei* selektiv zu binden. Proteine, die mit dem Matrix-gebundenen Gvp-Protein interagierten, wurden dann durch entsprechend gewählte Elutionsbedingungen von der Matrix isoliert und mittels SDS-PAGE analysiert. Das Prinzip des Nachweises von Protein-Protein-Interaktionen mittels Affinitätschromatographie mit einer Ni-NTA-Matrix mit gebundenem Gvp-His ist in Abb. 26 schematisch dargestellt.



**Abb. 26.** Prinzip des Nachweises von Protein-Protein-Interaktionen zwischen Gvp-His-Proteinen (hier z. B. GvpD-His) und möglichen Bindungspartnern aus *Hf. mediterranei*. Für den Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen wurde (A) eine Affinitätschromatographiematrix hergestellt, die gebundenes Gvp-His (Protein schematisch in rot, His-tag in dunkelblau) an einer Ni-NTA-Agarosematrix (schraffierte Fläche mit Ni-NTA in hellblau) enthielt. Mit dieser Affinitätschromatographiematrix wurde (B) lösliches Gesamtprotein von einer stationären, in Vollmedium mit 25% Salz gewachsenen *Hf. mediterranei*-Kultur inkubiert. Mögliche Bindungspartner für das an die Matrix koordinativ gebundene Gvp-His im Rohextrakt von *Hf. mediterranei* sollen dabei (C) an die Matrix binden, während alle anderen Proteine durch entsprechende Waschschrte entfernt werden können. Die anschließende Elution (C, D) mit Imidazol verdrängt (D) das Gvp-His von der Ni-NTA-Agarosematrix zusammen mit dem (den) eventuell assoziierten möglichen Bindungspartner(n).

Die hier beschriebene Methode ermöglicht auch die Detektion von anderen, nicht von der *mc-vac* kodierten Proteinen, die an der Regulation des *gvpA*-Promotors beteiligt sein könnten bzw. eine spezifische Wechselwirkung mit den Regulatoren GvpD-His oder GvpE-His zeigen. Die Bindung des His-tag-Proteins an die Ni-NTA-Matrix ist unabhängig von der Salzkonzentration in den verwendeten Puffern (Hochuli *et al.*, 1988). Die oben dargestellte Methode ist daher geeignet zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen bei hohen Salzkonzentrationen.

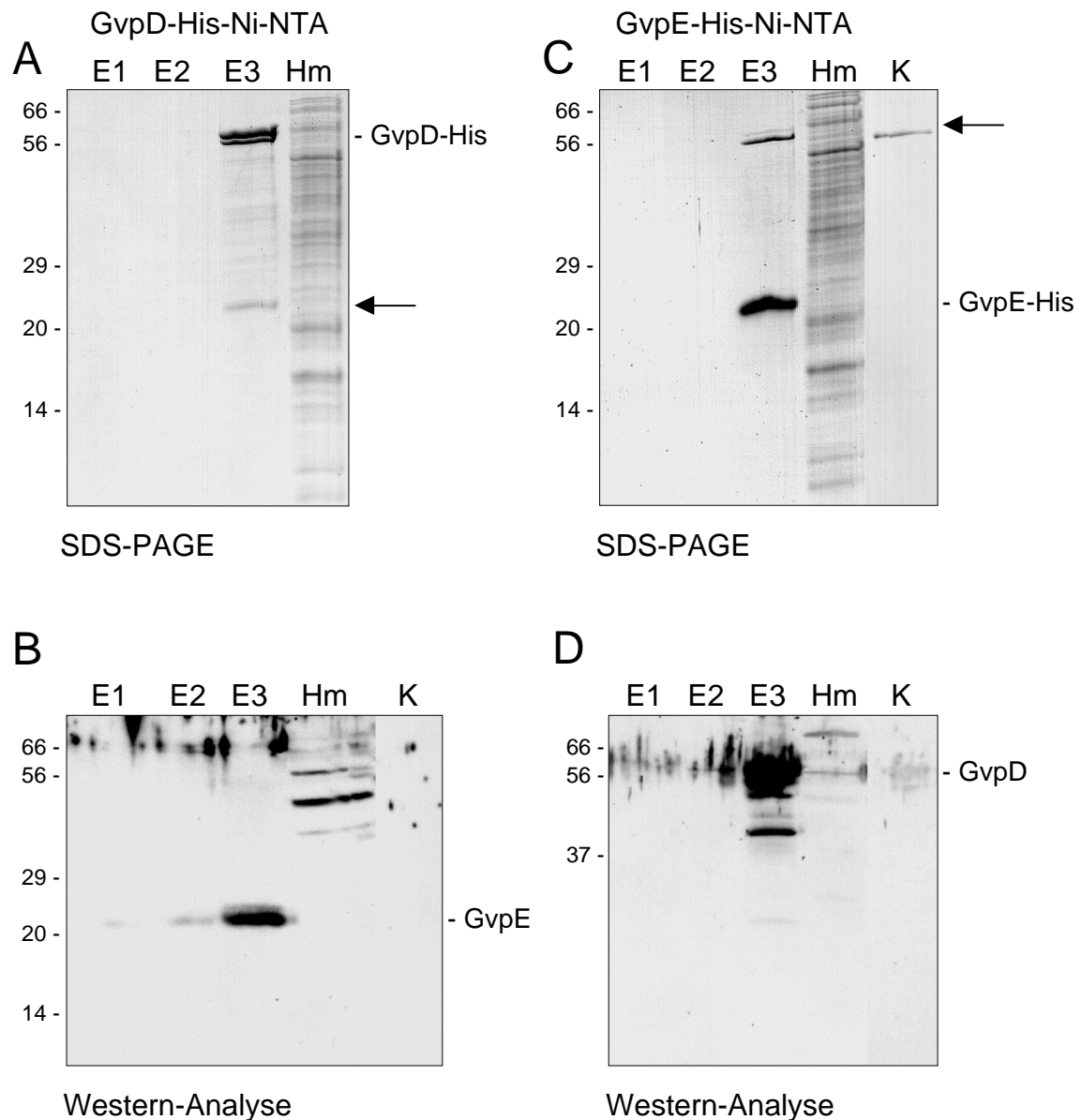
### 5.1. Identifizierung möglicher Bindungspartner der beiden Regulatoren GvpD und GvpE

Für den Nachweis von Proteinen aus *Hf. mediterranei*, die mit den beiden Genregulatoren GvpD und GvpE interagieren können, wurden zunächst die beiden Proteine als GvpD-His und GvpE-His an jeweils eine Ni-NTA-Agarose-Matrix mit einer Konzentration von 4 mg Protein pro ml Matrix gebunden. Nach Entfernen von überschüssigen, nicht gebundenen Gvp-His-Proteinen, wurden die Affinitätschromatographiematrices mit 40 mg/ml Matrixvolumen an löslichen Proteinen aus Gasvesikel-produzierenden Kulturen von *Hf. mediterranei* inkubiert. Nach diversen Waschschritten wurden putative Bindungspartner von GvpD-His bzw. GvpE-His durch drei aufeinanderfolgende Elutionsschritte entfernt. Der erste Elutionspuffer enthielt 2,5 M KCl bei pH 11 und sollte mögliche Interaktionen durch eine Erhöhung des pH-Wertes auflösen. Dieser Elutionsschritt wurde zweimal durchgeführt, um zu gewährleisten, dass für die Elution schließlich pH 11 erreicht wurde. Der zweite Elutionspuffer enthielt kein KCl, um mögliche Protein-Protein-Wechselwirkungen dadurch aufzulösen, dass den halophilen Proteinen das Salz fehlt, das sie in der Regel brauchen, um in einer stabilen und aktiven Form vorzuliegen. Der dritte Elutionspuffer schließlich enthielt 500 mM Imidazol, um das an die Matrix gebundene Gvp-His-Protein und alle mit diesem immer noch assoziierten Proteine zu eluieren. Von allen Elutionsschritten wurden Aliquots mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 27A und 27C).

Bei der Affinitätschromatographie mit gebundenem GvpD-His konnten mit den Elutionspuffern 1 und 2 keine Proteine im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel nachgewiesen werden (Abb. 27A). Mit dem Elutionspuffer 3 konnte das 61 kDa GvpD-His von der Ni-NTA-Agarose eluiert werden. Zusätzlich war in dem Eluat ein weiteres Protein nachweisbar, welches eine apparente molekulare Masse von 22-24 kDa hatte und damit von der Größe her ziemlich genau dem GvpE entsprach (Abb. 27A). Die Bande bei ca. 22-24 kDa war nicht bei der Auftrennung von gleichem Volumen eines Zellextrakts mit löslichen Proteinen von *Hf. mediterranei* nachweisbar, woraus zu schließen war, dass dieses Protein mittels der Affinitätschromatographie angereichert wurde. Die Frage, ob es sich bei dem nachgewiesenen Protein tatsächlich um GvpE handelte, wurde mit einer Western-Analyse mit einem GvpE-spezifischen Antiserum beantwortet. Das GvpE-spezifische Antiserum reagierte deutlich mit dem isolierten Protein der Masse 22-24 kDa in Elution 3, und auch in den Elutionen 1 und 2 waren Signale auf der gleichen Höhe erkennbar (Abb. 27B). Diese Analyse bestätigte die Vermutung, dass es sich bei dem im SDS-Polyacrylamidgel zusätzlich zu GvpD-His detektierten Protein um GvpE handelte. Es konnte des weiteren gezeigt werden, dass auch mit den

ersten beiden Elutionspuffern bereits geringe Mengen GvpE von der GvpD-His-Ni-NTA-Affinitätschromatographiematrix eluiert werden konnten. Die hier gewählten Elutionsbedingungen waren allerdings zu wenig effektiv, um einen quantitativen Nachweis von GvpE mittels Coomassie-Färbung im SDS-Polyacrylamidgel zu ermöglichen. In der Probe mit gleichem Volumen Rohextrakt von *Hf. mediterranei* war mit dem GvpE-spezifischen Antiserum kein Signal bei der entsprechenden Größe zu sehen, was vermutlich an der zu geringen Konzentration von GvpE im Rohextrakt von *Hf. mediterranei* lag (vgl. Western-Analyse zeitabhängige Produktion von GvpE, Kapitel 3, S. 68). Bei der Benutzung einer reinen Ni-NTA-Matrix ohne Gvp-His als Kontrolle in einem analogen Bindungsexperiment war kein GvpE nachweisbar. Diese Ergebnisse zeigten, dass GvpE aus einem Rohextrakt mit löslichen Proteinen von *Hf. mediterranei* mittels GvpD-His-Affinitätschromatographie isoliert und angereichert werden konnte.

Bei dem entsprechenden Affinitätschromatographie-Experiment mit gebundenem GvpE-His konnten mit den Elutionspuffern 1 und 2 ebenfalls keine angereicherten Proteine im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel nachgewiesen werden. Mit dem Elutionspuffer 3 wurden GvpE-His (22 kDa) und zwei weitere Proteine aus dem Rohextrakt mit löslichen Proteinen von *Hf. mediterranei* mit molekularen Massen im Bereich von 60-63 kDa von der Ni-NTA-Agarose eluiert (Abb. 27C). Die molekularen Massen dieser beiden zusätzlich eluierten Proteine lagen im Bereich der molekularen Masse von GvpD. In dem Kontrollexperiment mit reiner Ni-NTA-Agarose ohne gebundenem Gvp-His konnte jedoch ebenfalls ein Protein der molekularen Masse von ca. 60-63 kDa aus dem Rohextrakt mit löslichen Proteinen von *Hf. mediterranei* isoliert werden (Abb. 27C, Spur K). Eine anschließende Western-Analyse mit einem Antiserum, das spezifisch mit GvpD reagierte, sollte Aufschluß darüber geben, ob hier mit der GvpE-His-Ni-NTA-Matrix GvpD isoliert wurde. Das GvpD-spezifische Antiserum reagierte deutlich mit einem Protein der apparenten molekularen Masse von 60-63 kDa aus Elution 3 der GvpE-His-Affinitätschromatographie, wohingegen das entsprechende Protein aus dem Kontrollexperiment mit reiner Ni-NTA-Agarose nicht reagierte (Abb. 27D). Die Western-Analyse zeigte somit, dass auch GvpD aus einem Rohextrakt mit löslichen Proteinen von *Hf. mediterranei* mittels GvpE-His-Affinitätschromatographie isoliert werden konnte.



**Abb. 27.** Nachweis möglicher Protein-Protein-Interaktionen mit GvpD-His- bzw. GvpE-His-Matrices. Für die Analyse wurden 10 µl-Aliquots mittels SDS-PAGE aufgetrennt (A, C) und in Western-Analysen mit den entsprechenden GvpD- bzw. GvpE-spezifischen Antiseren eingesetzt (B, D). Die analysierten Proben stammten aus den Elutionsschritten 1-3 (E1, E2 und E3), aus dem Rohextrakt mit löslichem Gesamtprotein von *Hf. mediterranei* (Hm) und aus dem Elutionsschritt 3, einer Kontrolle mit reiner Ni-NTA-Agarosematrix ohne gebundenem Gvp-His (K). Die molekularen Massen (in kDa) der Protein-Größenstandards sind jeweils links angegeben. Die Laufweiten der im Elutionsschritt 3 eluierten Matrixproteine GvpD-His und GvpE-His sind jeweils rechts markiert. **A.** SDS-PAGE-Analyse der mit GvpD-His-Ni-NTA-Matrix isolierten Proteine. Das detektierte 22 kDa Protein wurde mit einem Pfeil markiert. **B.** Western-Analyse der in (A) mittels SDS-PAGE analysierten Proteine mit dem GvpE-spezifischen Antiserum. **C.** SDS-PAGE-Analyse der mit GvpE-His-Ni-NTA-Matrix isolierten Proteine. Die beiden detektierten 60-63 kDa Proteine wurden mit einem Pfeil markiert. **D.** Western-Analyse der in (B) mittels SDS-PAGE analysierten Proteine mit dem GvpD-spezifischen Antiserum.

In der Probe mit gleichem Volumen Rohextrakt von *Hf. mediterranei* war mit dem GvpD-spezifischen Antiserum nur ein schwaches Signal bei der entsprechenden Größe zu sehen, was vermutlich an der geringen Konzentration von GvpD im Rohextrakt von *Hf. mediterranei* lag

(vgl. Western-Analyse zeitabhängige Produktion von GvpD, Kapitel 3, S. 68). Dies zeigte, dass auch GvpD mit Hilfe der GvpE-Affinitätschromatographie aus *Hf. mediterranei* angereichert werden konnte.

Beide regulatorischen Proteine, GvpD und GvpE, können also gegenseitig aus *Hf. mediterranei* mit Hilfe der hier dargestellten Affinitätschromatographie isoliert werden. Dabei spielte es keine Rolle, welches Protein als His-tag-Fusionsprotein immobilisiert an der Ni-NTA-Matrix und welches frei in Lösung vorlag. Diese Ergebnisse geben einen guten Hinweis darauf, dass die beiden regulatorischen Proteine auch *in vivo* miteinander interagieren können.

## 5.2. Identifizierung möglicher Bindungspartner von GvpF, GvpG, GvpC und GvpN

In weiteren Analysen wurde mit der Methode der Affinitätschromatographie auch nach Bindungspartnern für die mc-vac-Proteine GvpF, GvpG, GvpC und GvpN gesucht. Dazu wurden in parallelen Ansätzen die genannten Proteine als Gvp-His-Fusionsproteine koordinativ an eine Ni-NTA-Agarose-Matrix gebunden und mit löslichen Proteinen aus Gasvesikelproduzierenden Kulturen von *Hf. mediterranei* inkubiert. Die Elution von putativen Bindungspartnern erfolgte in diesem Fall nur mit 2 verschiedenen Elutionspuffern. Mit dem ersten Elutionspuffer, der kein KCl enthielt, konnten keine Proteine im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel nachgewiesen werden. Mit dem zweiten Elutionspuffer, der Imidazol enthielt, wurde in zwei aufeinander folgenden Elutionsschritten jeweils das entsprechende Gvp-His von der Ni-NTA-Agarose eluiert sowie alle damit eventuell assoziierten Proteine (Abb. 28A). Zusätzlich zu dem jeweiligen His-tag-Fusionsprotein wurde auch wieder das bereits beschriebene Protein mit der molekularen Masse von 60-63 kDa aus *Hf. mediterranei* eluiert, welches offensichtlich unspezifisch an die Ni-NTA-Agarose binden konnte (Abb. 27C, Spur K; Abb. 28A, Spuren K1 und K2). Da dieses Protein in allen Eluat mit den verschiedenen Gvp-Affinitätschromatographiematrices und auch in der Kontrolle mit reiner Ni-NTA-Agarose auftrat, soll es im weiteren nicht weiter erwähnt werden.

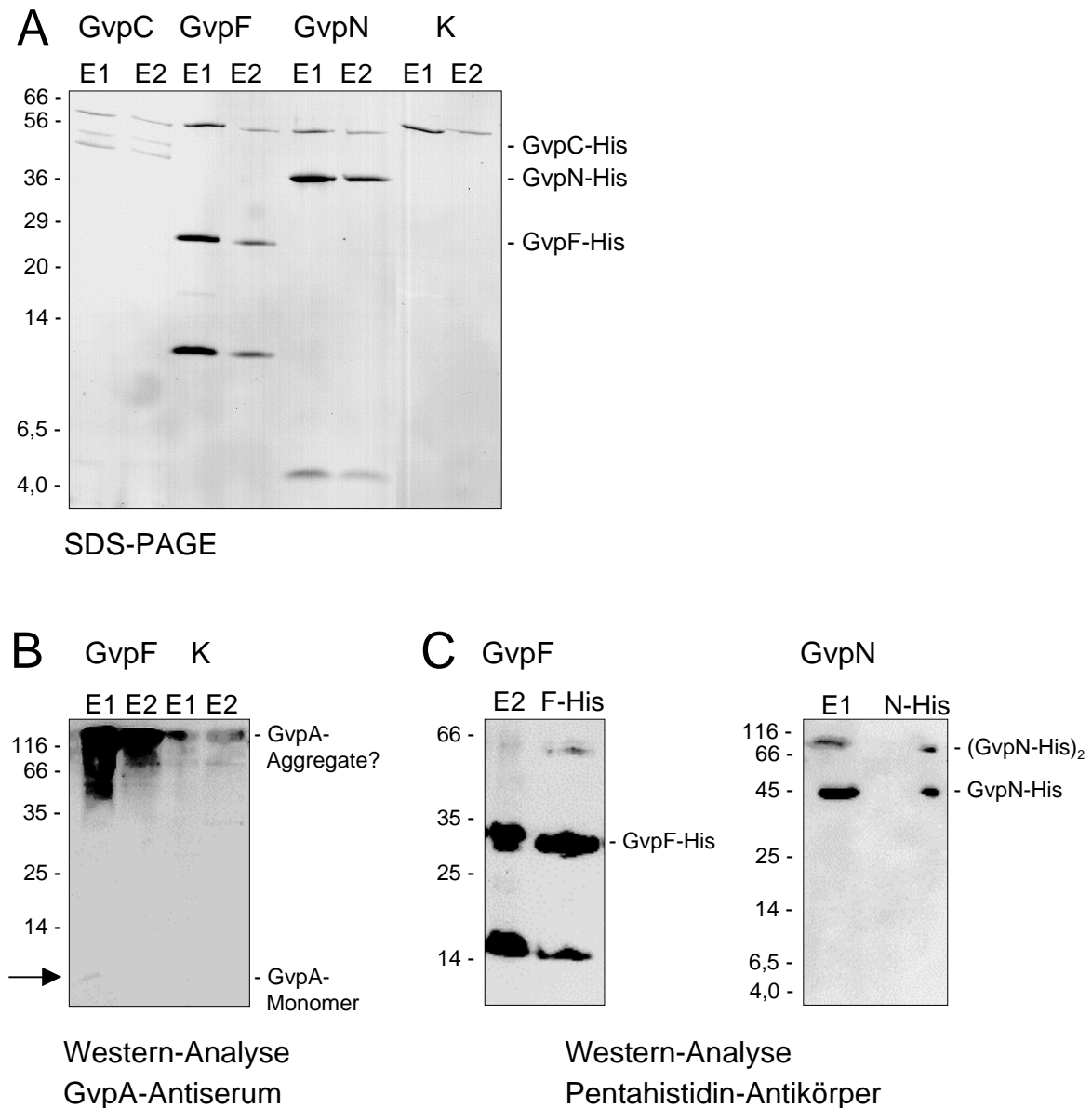
Bei der Affinitätschromatographie mit der GvpC-His-Matrix waren in den beiden Elutionsschritten mit Imidazol zwei Proteine mit einer apparenten molekularen Masse von ca. 40 und 43 kDa zu erkennen (Abb. 28A). Dabei handelte es sich um das bereits bei der Reinigung als Doppelbande aufgetretene GvpC-His (Abb. 10). Weitere Proteine aus *Hf. mediterranei* konnten mit Hilfe der GvpC-His-Affinitätschromatographie nicht isoliert werden.

Bei der Affinitätschromatographie mit der GvpF-His-Matrix wurden in den beiden Elutionsschritten mit Imidazol GvpF-His (24 kDa) und ein weiteres Protein mit einer molekularen Masse von ca. 10 kDa von der Ni-NTA-Agarose eluiert (Abb. 28A). Da bereits bei

der Aufreinigung von GvpF-His aus *E. coli* ein Protein mit der molekularen Masse von ca. 10 kDa in den Eluaten auftrat, lag die Vermutung nahe, dass es sich dabei um ein Abbauprodukt von GvpF handelte. Da dieses putative Abbauprodukt sich mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufreinigen ließ, mußte es sich gegebenenfalls um den N-terminalen Teil des Proteins handeln, der den Hexahistidin-tag besaß. Diese Vermutung wurde mittels einer Western-Analyse überprüft, bei der ein Antikörper eingesetzt wurde, der spezifisch gegen Pentahistidin gerichtet war. Diese Western-Analyse bestätigte, dass dieses 10 kDa große Polypeptid einen His-tag besaß und es sich somit um ein Abbauprodukt von GvpF-His handelte (Abb. 28C). Die Analyse der Eluate aus der GvpF-His-Affinitätschromatographie mittels SDS-PAGE erbrachte somit keine Hinweise auf mögliche Bindungspartner.

Mittels der GvpN-His-Affinitätschromatographie wurden in den beiden Elutions-schritten mit Imidazol GvpN-His (41 kDa) und ein weiteres Polypeptid mit einer molekularen Masse von ca. 5 kDa von der Ni-NTA-Agarose eluiert (Abb. 28A). Mit einer apparenten molekularen Masse von ca. 5 kDa ist das zusätzlich eluierte Protein allerdings zu klein, um ein Protein, das in der mc-vac-Region kodiert ist, darzustellen. Die Möglichkeit, dass es sich um ein GvpN-His-Abbauprodukt handelte ist gering, da eine solche zusätzliche Bande bei der Aufreinigung von GvpN-His in den Eluaten nicht detektierbar war. Die Western-Analyse mit dem Pentahistidin-Antikörper zeigte ebenfalls, dass das Protein nicht mit diesem reagierte, also kein N-terminales Abbauprodukt von GvpN war (Abb. 28C). Mit dem Pentahistidin-Antikörper konnte jedoch ein zweites, etwas schwächeres Signal bei einer molekularen Masse von ca. 80-85 kDa detektiert werden. Dies entspricht ziemlich genau dem doppelten Wert der molekularen Masse von GvpN-His. Da diese zweite 80-85 kDa-Bande auch bei der Analyse des gereinigten und mittels Dialyse zur Rückfaltung veranlassten GvpN-His detektierbar war, liegt die Vermutung nahe, dass GvpN im aktiven Zustand als Dimer vorliegt. Weitere Proteine aus *Hf. mediterranei* konnten mit Hilfe der GvpN-His-Affinitätschromatographie nicht isoliert werden.

Ebenso konnten mit der Affinitätschromatographie mit der GvpG-His-Matrix keine möglichen Bindungspartner aus *Hf. mediterranei* isoliert werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 28.** Nachweis möglicher Protein-Protein-Interaktionen mit GvpC-His-, GvpF-His- bzw. GvpN-His-Matrices. Für die Analyse wurden 10 µl-Aliquots mittels SDS-PAGE aufgetrennt (A) und in Western-Analysen mit den entsprechenden Antiseren, die GvpA bzw. Pentahistidinsequenzen detektieren, eingesetzt (B, C). Die Proben stammten aus den Elutionsschritten 1 und 2 (E1, E2). Zur Kontrolle wurden auch die Elutionsschritte 1 und 2 mit einer reinen Ni-NTA-Agarosematrix ohne gebundenem Gvp-His (K) analysiert. Die molekularen Massen (in kDa) der Protein-Größenstandards sind jeweils links angegeben. Die Laufweiten der eluierten Matrixproteine GvpC-His, GvpF-His bzw. GvpN-His sind jeweils rechts markiert. **A.** SDS-PAGE-Analyse der mit GvpC-His-, GvpF-His- bzw. GvpN-His-Ni-NTA-Matrix isolierten Proteine. **B.** Western-Analyse der in (A) mittels SDS-PAGE analysierten Proteine mit dem GvpA-spezifischen Antiserum. Das an der Nachweisgrenze detektierte 8 kDa Protein ist mit einem Pfeil markiert. **C.** Western-Analyse der in (A) mittels SDS-PAGE analysierten Proteine mit dem Pentahistidin-spezifischen Antikörper.

Für die Identifizierung weiterer Proteine, die mögliche Bindungspartner für die getesteten Proteine GvpC-His, GvpF-His, GvpG-His und GvpN-His sein könnten, wurden Western-Analysen mit den Eluaten aus den entsprechenden Affinitätschromatographieexperimenten und allen, für die verschiedenen Gvp-Proteine verfügbaren Antiseren, durchgeführt. Da in den



Eluaten der Affinitätschromatographieexperimente keine Gvp-Proteine als Bindungspartner gefunden wurden, sollte auf diesem Weg noch einmal getestet werden, ob sich geringe Mengen interagierender Gvp-Proteine mit Hilfe der entsprechenden Antiseren nachweisen ließen.

Mit den Antiseren, die spezifisch mit GvpD, GvpE, GvpC und GvpF reagieren, wurden keine Signale erhalten. Daraus folgte, dass diese Proteine entweder nicht mit den Matrix-gebundenen Gvp-His-Proteinen interagieren konnten oder in zu geringer Menge im Lysat von *Hf. mediterranei* vorhanden waren. Mit dem Antiserum, das gegen Gasvesikel gerichtet ist und spezifisch mit GvpA reagiert, konnte mit den Eluaten der GvpF-His-Matrix ein starkes Signal am oberen Rand des Trenngels auf der Nitrocellulosemembran detektiert werden, das Aggregaten von GvpA entspricht (Abb. 28B). Das GvpA-Monomer mit der molekularen Masse von 8 kDa war in geringer Menge im ersten Eluat mit Imidazol nachweisbar. Dieses Ergebnis zeigte, dass Aggregate von GvpA aus einem Rohextrakt von *Hf. mediterranei* mittels GvpF-His-Affinitätschromatographie isoliert werden konnten und deutete an, dass GvpF und GvpA in *Hf. mediterranei* miteinander interagieren. Damit wäre GvpF ein Protein, das an der Bildung bzw. dem Aufbau der Gasvesikel beteiligt ist.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der Affinitätschromatographien zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen, dass die beiden regulatorisch wirksamen Proteine GvpD und GvpE miteinander interagieren können. Des weiteren deuteten die Experimente auch eine mögliche Interaktion zwischen GvpF und GvpA an. Mit GvpC, GvpN und GvpG als Matrix-gekoppelten Proteinen konnten dagegen keine Bindungspartner gefunden werden. Die Analysen zeigten jedoch, dass GvpN wahrscheinlich als Dimer vorlag.

## 6. Charakterisierung von GvpD

### 6.1. Untersuchung von Mutanten von GvpD zur funktionellen Charakterisierung

Transformanten von *Hf. volcanii*, die die gesamte mc-vac-Region mit allen 14 Genen enthalten, bei denen jedoch der Leserahmen von *gvpD* eine 918 bp-Deletion besitzt ( $\Delta D$ -Transformanten) sind Gasvesikel-Überproduzenten und erscheinen wegen der stark lichtbrechenden Eigenschaften der Gasvesikel als weiße Kolonien auf Agarplatten (Englert *et al.*, 1992b; Abb. 3). Transformanten von *Hf. volcanii*, die zusätzlich zum  $\Delta D$ -Konstrukt den Leserahmen von *gvpD* in dem halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35 unter der Kontrolle des starken Ferredoxin-Promotors besitzen ( $\Delta D/D^{\text{ex}}$ -Transformanten), bilden dagegen keine Gasvesikel und erscheinen daher auf Agarplatten wie der Wildtyp von *Hf. volcanii* als rote Kolonien (Pfeifer *et al.*, 1994; Abb. 3). Die Phänotypen dieser Transformanten verdeutlichen

die Beteiligung von GvpD an der Repression der Gasvesikelbildung. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von GvpD zeigt drei interessante Bereiche, die für dessen Funktion wichtig sind: Nahe dem N-Terminus von GvpD befindet sich ein sogenanntes *p-loop*-Motiv (Walker A-Motiv, Position 36-46), das ein mögliches ATP-/GTP-Bindemotiv darstellt und für die reprimierende Funktion von Bedeutung ist (Zotzel, 1998; Pfeifer *et al.*, 2001). Des weiteren befinden sich in der Aminosäuresequenz noch zwei basische Regionen (Positionen 201-222 und 494-499), die putative DNA-Binderegionen darstellen können und von denen zumindest die erste Region (Position 201-222) wichtig für die reprimierende Wirkung von GvpD ist (Kurenbach, 1999; Pfeifer *et al.*, 2001).

Im Rahmen der Diplomarbeiten von Jens Zotzel (1998) und Brigitta Kurenbach (1999) wurden die konservierten Aminosäuren des *p-loop*-Motivs, sowie die basischen Aminosäuren in den beiden basischen Regionen ausgetauscht (Tabelle 7). Die Herstellung der Mutanten von *gvpD* erfolgte in beiden Arbeiten durch ortsgerichtete PCR-Mutagenese, bei der die Codons für die entsprechenden Aminosäurereste verändert wurden. Die veränderten *gvpD*-Leserahmen wurden in  $\Delta D/D_{mut}^{ex}$ -Transformanten von *Hf. volcanii* im Expressionsvektor pJAS35 auf ihre Fähigkeit untersucht, die Gasvesikelbildung zu reprimieren. Dabei zeigte eine Überexpression von Gasvesikeln an, dass das entsprechend mutagenisierte GvpD<sub>mut</sub> nicht mehr aktiv und damit die ausgetauschte Aminosäure essentiell für dessen Funktion war. Die Veränderungen in den *gvpD*<sub>mut</sub>-Leserahmen sowie die Phänotypen der entsprechenden *Hf. volcanii*-Transformanten mit den veränderten GvpD-Proteinen sind in Tabelle 7 kurz zusammengefasst.

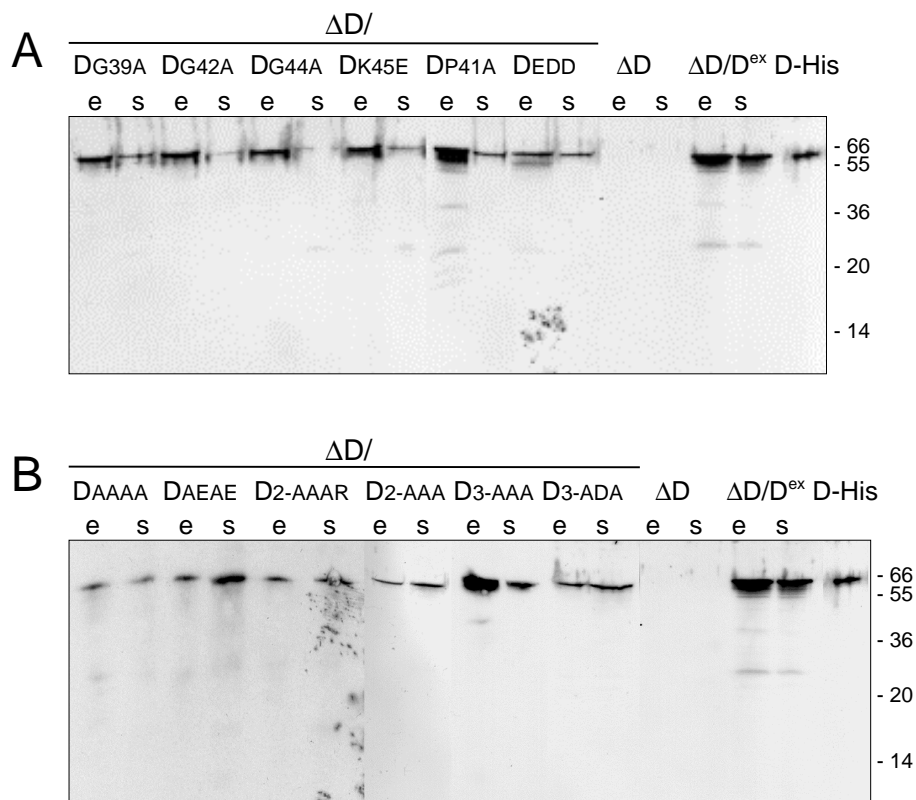
Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere Analysen mit den im *p-loop*-Motiv und in den beiden basischen Regionen veränderten GvpD<sub>mut</sub>-Proteinen durchgeführt. Dabei sollte zunächst nachgewiesen werden, ob alle mutagenisierten Proteine in den  $\Delta D/D_{mut}^{ex}$ -Transformanten von *Hf. volcanii* auch tatsächlich produziert werden und in den Transformanten nachweisbar sind und die Überexpression von Gasvesikeln bei allen Transformanten wirklich auf ein inaktives GvpD<sub>mut</sub>-Protein zurückzuführen ist und nicht auf der Tatsache beruht, dass das veränderte Protein nicht oder in zu geringer Menge gebildet oder schneller degradiert wurde.

Weiterhin wurde mittels Northern-Analysen die Wirkung von GvpD und der verschiedenen GvpD<sub>mut</sub>-Proteine auf die Aktivität des *mcA*-Promotors untersucht. Dabei sollte v. a. herausgefunden werden, ob die Aktivität von GvpD direkt oder indirekt einen Einfluß auf die Menge der gebildeten *gvpA*-mRNA und damit auf die Regulation des *mcA*-Promotors hat und ob die Region mit dem *p-loop*-Motiv bzw. die beiden basischen Regionen dabei von Bedeu-



### 6.1.1. Nachweis der GvpD<sub>mut</sub>-Proteine

Der Nachweis der GvpD<sub>mut</sub>-Proteine in den entsprechenden *Hf. volcanii*-Transformanten erfolgte mittels Western-Analyse mit einem Antiserum, das spezifisch mit GvpD reagierte. Das GvpD-Antiserum reagierte mit der Kontrolle, die das gereinigte GvpD-His enthielt, dem nativen GvpD in der  $\Delta D/D^{ex}$ -Transformante und allen GvpD<sub>mut</sub>-Proteinen in den  $\Delta D/D^{mut^{ex}}$ -Transformanten (Abb. 30). Mit der  $\Delta D$ -Transformante war dagegen keine Reaktion nachweisbar. Aufgrund der starken Aktivität des *fdx*-Promotors in den *gvpD<sub>mut</sub>/pJAS35*-Transformanten in der frühen Wachstumsphase waren die GvpD-Proteine vor allem in dieser Phase nachweisbar. Da in allen Transformanten das GvpD<sub>mut</sub>-Protein nachweisbar war, ist die Überproduktion von Gasvesikeln in den entsprechenden  $\Delta D/D^{mut^{ex}}$ -Transformanten auf ein gebildetes, aber inaktives GvpD-Protein zurückzuführen. Der Phänotyp *Vac<sup>++</sup>* kam in den  $\Delta D/D^{mut^{ex}}$ -Transformanten daher nicht durch das Fehlen von GvpD wie in der  $\Delta D$ -Transformante zustande.



**Abb. 30.** Western-Analysen zum Nachweis der GvpD<sub>mut</sub>-Proteine in den  $\Delta D/D^{mut^{ex}}$ -Transformanten. In jeder Spur wurden 10  $\mu$ g lösliche Proteine mittels 15%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, die (e) aus der exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600} = 0,2-0,3$ ), und (s) aus der stationären Wachstumsphase ( $OD_{600} > 2$ ) isoliert wurden. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit dem GvpD-spezifischen Antiserum inkubiert. Die molekularen Massen (in kD) des Protein-Größenstandards sind rechts angegeben.

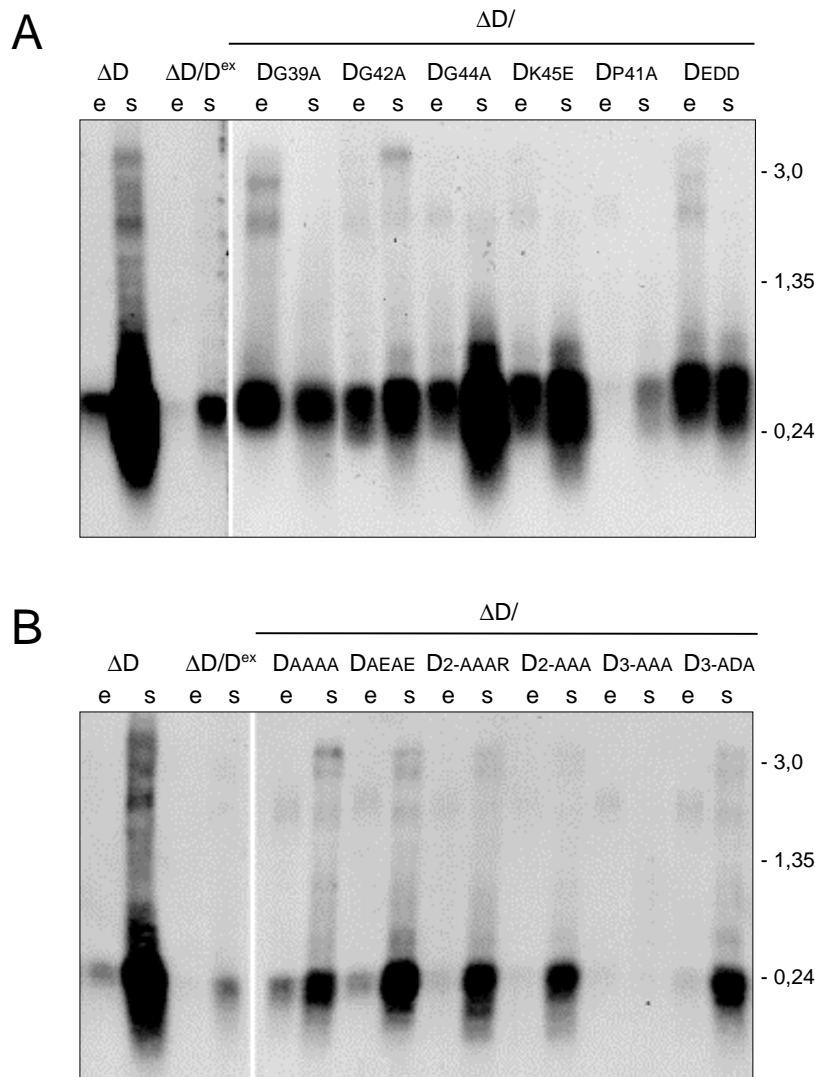
### 6.1.2. Auswirkungen der veränderten GvpD-Proteine auf die Regulation des mcA-Promotors

Um den Einfluß von GvpD und den hergestellten Mutanten von GvpD auf die Aktivität des mcA-Promotors zu untersuchen, wurden Northern-Analysen mit einer strangspezifischen RNA-Sonde (A-Sonde, Abb. 29) durchgeführt. Dabei wurden Transkripte, die vom mcA-Promotor aus starteten, in der exponentiellen und in der stationären Wachstumsphase analysiert. Die  $\Delta D$ -Transformante enthält bereits in der exponentiellen Wachstumsphase deutlich nachweisbare Mengen des 0,32 kb großen *gvpA*-Transkripts (Englert *et al.*, 1992b; Abb. 31). Dies steht im Gegensatz zu dem Transkriptionsmuster der Wildtyp-mc-vac-Region in *Hf. mediterranei* und in Transformanten von *Hf. volcanii*, die die gesamte mc-vac-Region besitzen, wo die *gvpA*-mRNA-Bildung in der exponentiellen Wachstumsphase reprimiert ist (Englert *et al.*, 1992b; Abb. 5). Mit der  $\Delta D$ -Transformante lassen sich jedoch vor allem in der stationären Wachstumsphase sehr große Mengen des 0,32 kb großen *gvpA*-Transkripts nachweisen. Im Vergleich hierzu waren die Mengen an *gvpA*-mRNA in der  $\Delta D/D^{ex}$ -Transformante in beiden Wachstumsphasen deutlich reduziert (Abb. 31). Diese Ergebnisse zeigten, dass die Verfügbarkeit von GvpD mit der Menge an gebildeter *gvpA*-mRNA korrelierte und dass GvpD daher direkt oder indirekt an der Reduktion der GvpE-vermittelten Aktivierung des mcA-Promotors beteiligt ist. Die Analyse der *gvpA*-mRNA-Menge in den  $\Delta D/D^{mut^{ex}}$ -Transformanten, die Aminosäure-Austausche an konservierten Positionen innerhalb des *p-loop*-Motivs hatten (DG39A, DG42A, DG44A, DK45E und DEDD), zeigte, dass alle Transformanten relativ große Mengen an *gvpA*-mRNA in der exponentiellen und in der stationären Wachstumsphase bildeten (Abb. 31A). Die Kontrolltransformante, bei der ein nichtkonserviertes Prolin innerhalb des *p-loop*-Motivs ausgetauscht wurde (DP41A), zeigte im Gegensatz dazu geringere Mengen an *gvpA*-mRNA, ähnlich der  $\Delta D/D^{ex}$ -Transformante mit dem Wildtyp-GvpD. Die Ergebnisse der Northern-Analysen decken sich somit mit den Ergebnissen der phänotypischen Charakterisierung der *p-loop*-Mutanten (Abb. 3, Tabelle 7) und deuten an, dass das *p-loop*-Motiv im GvpD wichtig ist für die Reduktion der Gasvesikelbildung auf der Ebene der Transkriptionsregulation des mcA-Promotors.

Die  $\Delta D/D^{mut^{ex}}$ -Transformanten mit Aminosäure-Austauschen innerhalb der beiden basischen Regionen von GvpD enthielten große Mengen an *gvpA*-mRNA nur während der stationären Wachstumsphase (Abb. 31B). Im Gegensatz zu den  $\Delta D/D^{mut^{ex}}$ -Transformanten mit Aminosäure-Austauschen im *p-loop*-Motiv waren hier in der exponentiellen Wachstumsphase nur sehr geringe Mengen oder gar keine *gvpA*-mRNA nachweisbar. Die  $\Delta D/D3-AAA^{ex}$ -Mutante (Vac-, Abb. 3) zeigte eine Reprimierung der *gvpA*-mRNA-Bildung während

des gesamten Wachstums. Der Austausch aller drei Arginine gegen Alanine in der basischen Region 2 produzierte hier offenbar einen Repressor, dessen Aktivität viel stärker war, als die des natürlichen GvpDs und die *gvpA*-mRNA-Bildung während dem gesamten Wachstum verhinderte.

Die Tatsache, dass sowohl einzelne Aminosäure-Austausche im *p-loop*-Motiv als auch solche in den basischen Regionen zu einer Überproduktion von Gasvesikeln und einer erhöhten Menge von *gvpA*-mRNA in der stationären Wachstumsphase führten, zeigte, dass diese Motive wichtig sind für die regulatorische Funktion von GvpD bei der Regulation des *mcA*-Promotors. Die Northern-Analysen mit der strangspezifischen *gvpA*-mRNA-Sonde zeigten dabei, dass das *p-loop*-Motiv im GvpD für die Regulation sowohl in der exponentiellen als auch in der stationären Wachstumsphase wichtig ist, die basischen Regionen aber vermutlich nur bei der Regulation der *gvpA*-mRNA-Bildung in der stationären Phase von Bedeutung sind. Diese Ergebnisse deuten an, dass sich die Funktion von GvpD möglicherweise bei der Regulation der *mcA*-Promotoraktivität in der exponentiellen Wachstumsphase von derjenigen in der stationären Wachstumsphase unterscheidet.



**Abb. 31.** Northern-Analysen zum Nachweis der *gvpA*-mRNA in den  $\Delta D/D^{mut^{ex}}$ -Transformanten. In jeder Spur wurden 5  $\mu$ g Gesamt-RNA aufgetragen, die (e) aus der exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600} = 0,2-0,3$ ), und (s) aus der stationären Wachstumsphase ( $OD_{600} > 2$ ) isoliert wurden. Die RNA wurde mittels 1,2%igen Formaldehyd-enthaltenden Agarosegelen aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit der *gvpA*-spezifischen RNA-Sonde (A-Sonde, Abb. 29) hybridisiert. Die Längen (in kb) des RNA-Größenstandards sind rechts angegeben. Die Exponierungszeiten der Röntgenfilme für das Digoxigenin-Detektionssystem waren für die obere und die untere Membran leicht unterschiedlich, wie man an den Signalen der Kontrolltransformanten  $\Delta D$  und  $\Delta D/D^{ex}$  erkennen kann.

## 6.2. Nachweis der möglichen ATP-/GTP-Bindung von GvpD mittels Affinitätschromatographie/Dünnschichtchromatographie

Die Untersuchungen der  $\Delta D/D^{mut^{ex}}$ -Transformanten mit Aminosäureaustauschen im *p-loop*-Motiv von GvpD zeigten, dass dieses Motiv wichtig ist für die repressorische Funktion von GvpD. Das *p-loop*-Motiv stellt eine mögliche ATP/GTP-Bindestelle dar. Deshalb war es von Interesse, die ATP/GTP-Bindefunktion an dem gereinigten GvpD-Protein zu testen.

Für diesen Nachweis wurde GvpD als His-tag-Fusionsprotein in *E. coli* produziert, mittels Metallionenaffinitätschromatographie aufgereinigt und zur Rückfaltung schrittweise gegen salzhaltige Puffer dialysiert, bis zu einer Konzentration von 2,5 M KCl. GvpD-His wurde anschließend an eine Ni-NTA-Matrix gebunden, um eine Matrix mit GvpD-His als koordinativ gebundenen Liganden herzustellen.

Zum Nachweis der möglichen ATP- bzw. GTP-bindenden Funktion von GvpD wurde die GvpD-His-Matrix mit einem ATP- bzw. GTP-haltigen Puffer inkubiert. Die Mengenverhältnisse wurden dabei so eingestellt, dass die Matrix mit 400 µg GvpD-His (entspricht 6,6 nmol) mit einem Puffer inkubiert wurde, der 200 nmol ATP bzw. GTP enthielt. Die Nukleosidtriphosphate waren somit im 30-fachen Überschuß zum immobilisierten GvpD-His vorhanden. Das nicht gebundene ATP oder GTP wurde durch mehrere Waschschrte mit 2,5 M KCl entfernt. Eventuell gebundenes ATP oder GTP sollte anschließend durch Elutionsschritte mit verschiedenen Elutionspuffern von der Matrix eluiert werden. Das Prinzip des Nachweises der ATP-/GTP-Bindung war analog zu den Protein-Protein-Interaktions-Experimenten (vergleiche schematische Darstellung in Abb. 26). Der Unterschied bestand vor allem darin, dass die GvpD-His-Matrix mit ATP bzw. GTP statt mit Proteinen aus *Hf. mediterranei* inkubiert wurde.

Der erste Elutionspuffer enthielt 0,15 M KCl (statt 2,5 M KCl) bei einem pH-Wert von 11 und sollte die putative ATP-/GTP-Bindung von GvpD durch eine niedrige Salzkonzentration und eine Erhöhung des pH-Wertes auflösen. Dieser Elutionsschritt wurde zweimal durchgeführt (E1, E2), um zu gewährleisten, dass für die Elution pH 11 erreicht wurde. Der zweite Elutionspuffer (E3) enthielt 500 mM Imidazol, um das an die Matrix gebundene GvpD-His und eventuell damit immer noch assoziiertes ATP/GTP zu eluieren. Die drei Eluate wurden auf ein Volumen von 20 µl eingengt und mittels hochauflösender Dünnschichtchromatographie (HPTLC) analysiert. Als Vergleich dienten die entsprechenden Reinsubstanzen ATP, ADP, GTP und GDP sowie eine Matrix-Kontrolle ohne gebundenem GvpD-His. Die Dünnschichtchromatographieplatten enthielten einen Fluoreszenzmarker, der bei 254 nm angeregt werden konnte. Die Visualisierung der Nukleotide erfolgt hier durch Fluoreszenzlöschung, wodurch die Nukleotide als dunkle Flecken im UV-Licht erscheinen (Kelly & Wood, 1994).

Bei der Affinitätschromatographie mit gebundenem GvpD-His und ATP im Inkubationspuffer konnten mit dem ersten Elutionspuffer auf der Dünnschichtchromatographieplatte zwei Banden mit  $R_f$ -Werten von 0,25 und 0,19 detektiert werden (Abb. 32A, GvpD-His: E1, E2). Die Elution mit dem Imidazol-enthaltenden Elutionspuffer 2 lieferte dagegen keine

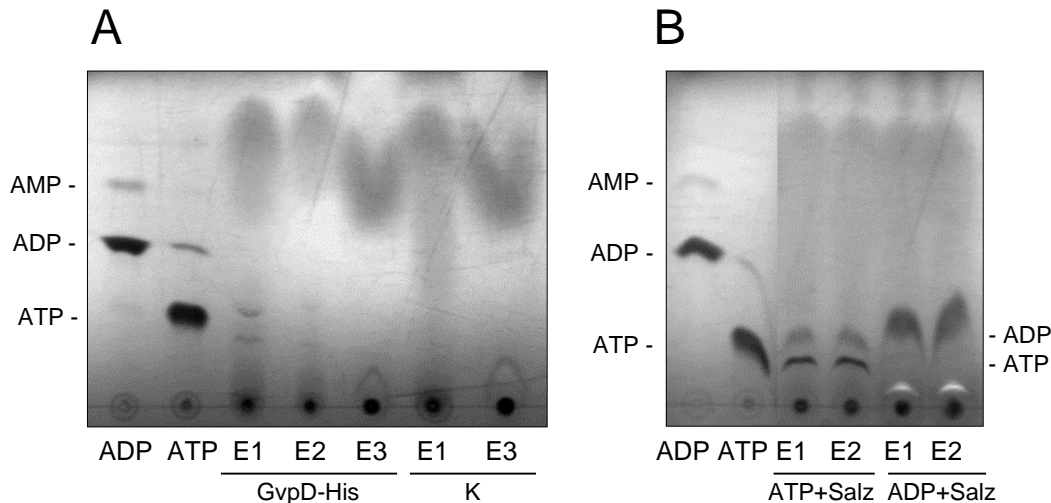


Signale (Abb. 32A, GvpD-His: E3). Ebenso wurde in allen Eluaten der Kontroll-Affinitätschromatographie, bei der reine Ni-NTA ohne GvpD-His mit ATP inkubiert wurde, kein Signal erhalten (32A, K). Der Vergleich mit den Referenzsubstanzen zeigte, dass die beiden Banden mit  $R_f$ -Werten von 0,25 und 0,19 nicht wie erwartet bis zur gleichen Höhe liefen wie ATP und ADP. Mit der Referenzsubstanz ADP wurden zwei Signale erhalten, die beide höher lagen als die Signale in den Eluaten (Abb. 32, ADP). Bei dem unteren Hauptsignal handelte es sich um ADP, bei dem höher gelegenen, schwächeren Signal handelte es sich um AMP, das durch die teilweise nichtenzymatische Dephosphorylierung von ADP entstand (Vergleich mit Referenzsubstanz AMP hier nicht gezeigt; Zimmermann *et al.*, 1999). Mit der Referenzsubstanz ATP wurden zwei Signale erhalten, bei der das untere Hauptsignal für ATP in der Laufweite zwischen den beiden Signalen der Eluate lag (Abb. 32, ATP). Bei dem höher gelegenen, schwächeren Signal handelte es sich um ADP, das durch die teilweise nichtenzymatische Dephosphorylierung von ATP entstand. Da die Eluate durch das Aufkonzentrieren hohe Salzkonzentrationen enthielten (Konzentrierung von 200  $\mu$ l auf 20  $\mu$ l erhöhte KCl-Konzentration von 0,15 M auf 1,5 M in den aufgetragenen Proben), bestand die Vermutung, dass die hohen Salzkonzentrationen in den Proben die Laufeigenschaften von Nukleosidphosphaten bei der Dünnschichtchromatographie veränderten. Daher wurde trotz der unterschiedlichen  $R_f$ -Werte der Substanzen in den Eluaten vermutet, dass es sich hierbei um ATP und ADP handelte.

Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden die Referenzsubstanzen unter identischen Salzbedingungen zu den Eluaten auf Dünnschichtchromatographieplatten aufgetragen. Als Vergleich wurden ebenfalls die salzfreien Referenzsubstanzen aufgetragen. Die Analyse mittels Dünnschichtchromatographie bestätigte die Vermutung, dass die Salzkonzentration die Laufeigenschaften von ATP und ADP stark beeinträchtigte. In den Spuren, wo ATP unter „Eluatbedingungen“ aufgetragen wurde, waren Signale für ATP und in geringem Maße auch für ADP erkennbar, die unterhalb bzw. oberhalb der salzfreien ADP-Bande lagen (Abb. 32B, ATP+Salz: E1, E2).

Damit waren die Banden für ATP und ADP in den Kontrollen unter „Eluatbedingungen“ auf identischer Höhe wie die beiden Signale in dem Eluat, bei dem GvpD-His-Ni-NTA mit ATP inkubiert wurde (Abb. 32A, GvpD-His). Mit Hilfe dieses Kontroll-experiments lässt sich daher die Aussage machen, dass es sich bei den beiden Substanzen mit hoher Wahrscheinlichkeit um ATP und ADP handelte.

In analoger Weise wurden die Experimente ebenso mit GTP im Inkubationspuffer durchgeführt. In diesem Fall konnte jedoch mittels Dünnschichtchromatographie kein Signal in den Eluaten detektiert werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 32.** Hochauflösende Dünnschichtchromatographie zur Auftrennung von Nukleosidphosphaten und Elutionen aus der Affinitätschromatographie zum Nachweis einer ATP-bindenden Funktion von GvpD. Die Eluate wurden auf ein Volumen von 20  $\mu$ l konzentriert und als 1  $\mu$ l-Aliquots auf die Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen. **A.** Proben aus den Elutionsschritten E1, E2 und E3 der Affinitätschromatographie mit GvpD-His-Ni-NTA und ATP (GvpD-His) und aus den Elutionsschritten E1 und E3 einer Kontrolle (K) mit reiner Ni-NTA-Agarose ohne GvpD-His, inkubiert mit ATP. Als Referenzen dienen die Reinsubstanzen ATP und ADP bei Abwesenheit von KCl (ADP, ATP). **B.** Referenzen der Reinsubstanzen ATP und ADP bei Abwesenheit von KCl (ADP, ATP) und bei Anwesenheit von KCl (ATP+Salz, ADP+Salz). Letztere sind Kontrollen wie die Probe „K“ (A), die nach den Elutionen mit ATP bzw. ADP versetzt wurden.

Mit Hilfe der Affinitätschromatographie konnte somit gezeigt werden, dass das immobilisierte GvpD-His ATP aus einem ATP-haltigen Puffer binden konnte und dieses durch hochauflösende Dünnschichtchromatographie nachweisbar war. In dem Kontrollexperiment mit reiner Ni-NTA konnte keine Bindung von ATP nachgewiesen werden. Ebenso konnte in einem weiteren Experiment die Bindung von GTP durch eine GvpD-His-Ni-NTA-Matrix nicht nachgewiesen werden.

# Diskussion

In dieser Arbeit wurden Experimente zur Untersuchung der Regulation der Gasvesikelbildung in dem moderat halophilen Archaeon *Hf. mediterranei* durchgeführt. *Hf. mediterranei* bildet Gasvesikel nur in der stationären Wachstumsphase und nur in Medien mit mindestens 17% Salz (Rodriguez-Valera, 1980, 1983; Englert *et al.*, 1990). Die Transkription der Gasvesikel-gene-kodierenden mc-vac-Region ist abhängig von zwei Promotoren, die sich vor den Genen *gvpA* (mcA-Promotor) und *gvpD* (mcD-Promotor) befinden, und die Genprodukte von *gvpD* und *gvpE* sind an deren Regulation beteiligt. Die wachstumsphasenabhängige Regulation der Gasvesikelbildung spiegelt sich in der Regulation des mcA-Promotors wieder, denn die entsprechenden Transkripte, die für die Hauptstrukturproteine GvpA und GvpC kodieren, werden nur während der stationären Wachstumsphase gebildet. Der Transkriptionsaktivator GvpE aktiviert den mcA-Promotor, wohingegen GvpD an der Repression der Gasvesikelbildung beteiligt ist (Englert *et al.*, 1992b; Röder & Pfeifer, 1996). Die abgeleitete Aminosäuresequenz von GvpD zeigt drei Motive, die wichtig für dessen repressorische Funktion sind: ein *p-loop*-Motiv, das eine mögliche ATP-/GTP-Bindestelle darstellt und zwei basische Regionen, die mögliche DNA-Binderegionen darstellen könnten (Zotzel, 1998; Kurenbach, 1999; Pfeifer *et al.*, 2001). Untersuchungen mit *Hf. volcanii*-Transformanten zeigten, dass GvpE für die Aktivierung des mcA-Promotors ausreicht, für die Repression des mcA-Promotors zusätzlich zu GvpD jedoch weitere Proteine nötig sind (Röder & Pfeifer, 1996; Röder, 1997; Gregor & Pfeifer, 2001).

In dieser Arbeit wurde die Aktivierung und Reprimierung der Gasvesikelbildung in dem halophilen Archaeon *Haloferax mediterranei* in drei Punkten untersucht:

1. Untersuchungen zur Charakterisierung der Aktivierung und Reprimierung des mcA-Promotors durch GvpD und GvpE
2. Untersuchungen zur Charakterisierung des Einflusses von GvpF, GvpG und GvpN auf die Aktivierung und Reprimierung des mcA-Promotors
3. Charakterisierung von GvpD

## 1. Untersuchungen zur Charakterisierung der Aktivierung und Reprimierung des mcA-Promotors durch GvpD und GvpE

### 1.1. Northern-Analysen von *Hf. volcanii*-Transformanten

Frühere Untersuchungen mit *Hf. volcanii*-ADE-Transformanten zeigten, dass GvpD alleine nicht ausreichte, um die *gvpA*-mRNA-Bildung in der exponentiellen Wachstumsphase zu reprimieren. Mit der G-N-Transformante (enthält *gvpDEFG-gvpACN*) konnte jedoch die Repression der *gvpA*-mRNA-Bildung in der exponentiellen Wachstumsphase beobachtet werden (Röder & Pfeifer, 1996; Röder, 1997).

In dieser Arbeit wurden zunächst Kontrollversuche mit *Hf. volcanii*-ADE-, AΔDE-, und G-N-Transformanten durchgeführt. Die RNA-Analysen der G-N-Transformante bestätigten, dass nur sehr geringe Mengen *gvpA*-mRNA in der exponentiellen Wachstumsphase nachweisbar waren und größere Mengen erst in der stationären Wachstumsphase gebildet wurden, was der vollständigen Regulation des mcA-Promotors in *Hf. mediterranei* entspricht. Die ADE- und AΔDE-Transformanten enthielten hingegen, verglichen mit der G-N-Transformante, beide relativ große Mengen an *gvpA*-mRNA bereits in der exponentiellen und auch deutlich größere Mengen *gvpA*-mRNA in der stationären Wachstumsphase. Diese Ergebnisse bestätigten, dass mit dem ADE-Konstrukt alleine keine vollständige Repression des mcA-Promotors erreicht werden kann.

In der AΔDE/D<sup>ex</sup>-Transformante wurden durch die Überexprimierung von *gvpD* mit Hilfe des starken *fdx*-Promotors große Mengen von GvpD gebildet. In dieser Transformante konnten im Gegensatz zur ADE-Transformante nur sehr geringe Mengen *gvpA*-mRNA in der exponentiellen und auch geringere *gvpA*-mRNA-Mengen in der stationären Wachstumsphase detektiert werden. Die Expression von *gvpA* ähnelte hier der G-N-Transformante und zeigte eine Repression des mcA-Promotors in der exponentiellen Wachstumsphase. Diese Ergebnisse zeigten, dass GvpD doch für die Reprimierung der GvpE-vermittelten Aktivierung des mcA-Promotors ausreicht, wenn GvpD in sehr großen Mengen in der Zelle produziert wird. Aus der Tatsache, dass große GvpD-Mengen zu einer niedrigen mcA-Promotoraktivität in der AΔDE/D<sup>ex</sup>-Transformante führten, kann man schließen, dass GvpD als Repressor wirkt. Dabei blieb jedoch noch unklar, ob GvpD am mcA-Promotor wirkt und die Rekrutierung der RNA-Polymerase inhibiert oder ob GvpD mit GvpE interagiert und so die Aktivierung des mcA-Promotors verhindert. Für die Funktion weiterer, an der Regulation des *gvpA*-Promotors beteiligter Gene aus dem G-N-Bereich gibt es dadurch zwei Erklärungen: Die erste wäre, dass die Expression von *gvpD* oder die Menge von GvpD von anderen Genprodukten beeinflusst wird. Eine zweite Erklärung wäre, dass GvpD nur im Zusammenspiel mit weiteren Gvp-

Proteinen die vollständige Regulation am *gvpA*-Promotor bewirkt und alleine dazu zu wenig effizient ist. Die Überexpression von *gvpD* in der  $\Delta\Delta\Delta E/D^{ex}$ -Transformante könnte dementsprechend bewirkt haben, dass die niedrige Effizienz einer regulatorischen Aktivität von GvpD durch entsprechend größere Mengen von GvpD kompensiert wurde.

### 1.2. Reporteranalysen mit dem *bgaH*-Gen

Mit dem Reportergen *bgaH*, das für ein halophiles Protein mit einer  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität kodiert, wurde der Einfluß von GvpD und GvpE auf die Expression am *mcA*-Promotor in einer quantitativeren Weise untersucht. Für die Bestimmung der basalen Aktivität des *mcA*-Promotors wurde das *mcA-bgaH*-Konstrukt als Kontrolle benutzt (Gregor & Pfeifer, 2001). Mit einer *Hf. volcanii*-Transformante, die zusätzlich zu dem *mcA-bgaH*-Konstrukt das *gvpE*-pJAS35-Konstrukt ( $E^{ex}$ ) enthielt, konnte die Aktivierung des *mcA*-Promotors durch GvpE gemessen werden (Gregor & Pfeifer, 2001). Da für die Aktivierung außer GvpE keine weiteren Gvp-Proteine nötig sind, wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in dieser Kontroll-Transformante als die maximal mögliche Aktivität (100%) des *mcA*-Promotors angesetzt.

Im Mittelpunkt der durchgeführten Analysen stand die Frage, ob GvpD in der Lage ist, negativ auf die basale Promotoraktivität bzw. die durch GvpE aktivierbare Promotoraktivität zu wirken. Dazu wurden Transformanten hergestellt, die das *mcA-bgaH*-Konstrukt (*mcA*) und zusätzlich *gvpD* ( $D^{ex}$ ) bzw. *gvpD* und *gvpE* ( $DE^{ex}$ ) unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors oder unter Kontrolle des nativen *mcD*-Promotors ( $DE^{mcD}$ ) enthielten. Letzteres Konstrukt enthielt im Gegensatz zu den anderen Konstrukten die vollständige Region mit dem *mcD*-Promotor sowie die Region, die für den 82 nt langen mRNA-*leader* von *gvpD* kodiert.

Die *mcA*-Transformante zeigte eine sehr niedrige basale  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Die Anwesenheit des Transkriptionsaktivators GvpE führte in der  $\underline{mcA/E^{ex}}$ -Transformante zu einer 82-fachen Aktivierung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität, verglichen mit der basalen Aktivität der *mcA*-Transformante. Die Ergebnisse dieser Kontrollexperimente stimmten dabei sehr genau mit den von Gregor & Pfeifer (2001) veröffentlichten Werten überein. In Tabelle 8 sind die Aktivierungsfaktoren der *mcA*-Promotor-abhängigen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der hier dargestellten *Hf. volcanii*-Transformanten aufgelistet.

Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der  $\underline{mcA/DE^{ex}}$ -Transformante waren ähnlich hoch wie diejenigen der  $\underline{mcA/E^{ex}}$ -Transformante. Die zusätzliche Anwesenheit von *gvpD* im  $DE^{ex}$ -Konstrukt führte damit zu keiner niedrigeren Aktivität als in der  $\underline{mcA/E^{ex}}$ -Transformante. Obwohl hier die Leserahmen von *gvpD* und *gvpE* unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors exprimiert wurden, zeigten Western-Analysen, dass nur geringe Mengen der beiden Proteine

in der Transformante vorhanden waren. Dies war im deutlichen Gegensatz zu den Transformanten, die jeweils nur *gvpD* ( $D^{ex}$ ) oder *gvpE* ( $E^{ex}$ ) unter *fdx*-Promotor-Kontrolle exprimierten und große Mengen der jeweiligen Proteine enthielten. Da die entsprechenden Northern-Analysen zur Detektion der jeweiligen mRNA zeigten, dass diese in etwa gleicher Menge in den Transformanten gebildet wurde, liegt die Vermutung nahe, dass die beiden Proteine sich möglicherweise gegenseitig negativ beeinflussen. Weiterhin war überraschend, dass trotz der niedrigen GvpE-Mengen in der *mcA/DE<sup>ex</sup>*-Transformante sehr hohe  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten erreicht wurden. Dies zeigte, dass bereits geringe Mengen an GvpE ausreichen, um den *mcA*-Promotor stark zu aktivieren.

Mit der *mcA/D<sup>ex</sup>*-Transformante wurde untersucht, ob GvpD einen Einfluß auf die basale Aktivität des *mcA*-Promotors hat. Dieses Experiment sollte zeigen, ob GvpD direkt am *mcA*-Promotor wirkt und dort dessen Aktivität reprimiert. Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der *mcA/D<sup>ex</sup>*-Transformante war jedoch nicht niedriger als die basale Aktivität der *mcA*-Transformante. Eine Reduktion der basalen *mcA*-Promotoraktivität durch GvpD konnte in diesem Experiment nicht gezeigt werden, was für eine indirekte Wirkung von GvpD, d. h. nur in Verbindung mit GvpE, am *mcA*-Promotor spricht.

**Tabelle 8. Aktivierungsfaktoren für die *mcA*-Promotor-abhängigen spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten in den *Hf. volcanii*-Transformanten**

Transformante	Einfluß der <i>gvp</i> -Gene	Faktor Aktivierung	% max. Aktivität
<i>mcA</i>	-	1	0,8
<i>mcA/E<sup>ex</sup></i>	<i>gvpE</i>	82	100
<i>mcA/DE<sup>ex</sup></i>	<i>gvpD</i> + <i>gvpE</i>	82	100
<i>mcA/D<sup>ex</sup></i>	<i>gvpD</i>	1	0,8
<i>mcA/DE<sup>mcD</sup></i>	<i>gvpD</i> + <i>gvpE</i>	27	28
<i>mcA-mcD-D</i>	<i>gvpD</i>	-	0
<i>mcA-mcD-ΔDE</i>	<i>gvpE</i>	96	100
<i>mcA-mcD-DE</i>	<i>gvpD</i> + <i>gvpE</i>	26	27

Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der *mcA/DE<sup>mcD</sup>*-Transformante waren um das dreifache erniedrigt gegenüber den *mcA/E<sup>ex</sup>*- und *mcA/DE<sup>ex</sup>*-Transformanten. Diese niedrigere Aktivität zeigte, dass sich die Wirkung von GvpD und GvpE auf den *mcA*-Promotor bei Expression unter der Kontrolle des *mcD*-Promotors von derjenigen bei Expression unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors unterschied.

Für die weitere Untersuchung der Regulation des *mcA*-Promotors wurden *Hf. volcanii*-Transformanten analysiert, die jeweils nur ein einziges Konstrukt trugen, bei dem der

mcA-Promotor die Expression des *bgaH*-Reportergens und der mcD-Promotor die Bildung der regulatorischen Proteine GvpD und GvpE kontrollierte. Für diese Untersuchungen diente die mcA-*bgaH*-Transformante wieder als Kontrolle für die basale Aktivität. Als Kontrolle für die maximale Promotoraktivität wurde die *Hf. volcanii*-Transformante mit dem mcA-mcD- $\Delta$ DE-Konstrukt verwendet. Dieses Konstrukt enthielt als funktionellen Leserahmen neben *bgaH* nur *gvpE* unter der Kontrolle des mcD-Promotors. Die Analyse der spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten in der mcA-mcD- $\Delta$ DE-Transformante zeigte, dass die Aktivitäten ungefähr gleich hoch wie in der mcA/ $E^{ex}$ -Transformante waren. Dies war überraschend, da die Expression von *gvpE* unter der Kontrolle des mcD-Promotors zu wesentlich geringeren GvpE-Mengen führt, wie in entsprechenden Western-Analysen bestätigt werden konnte. Dies zeigte wiederum, dass bereits geringe Mengen an GvpE in der Zelle ausreichen, um eine maximale Aktivierung des mcA-Promotors zu bewirken.

Die mcA-mcD-DE-Transformante zeigte während des gesamten Wachstums deutlich niedrigere  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten als die mcA-mcD- $\Delta$ DE-Transformante. Dieses Ergebnis stand im Gegensatz zu den Aktivitäten der mcA/DE $^{ex}$ -Transformante, die keine vergleichbar niedrigere Aktivitäten als die mcA/ $E^{ex}$ -Transformante hatte. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der mcA-mcD-DE-Transformante waren jedoch ähnlich wie diejenigen der mcA/DE $^{mcD}$ -Transformanten. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Expression von *gvpDE* unter der Kontrolle des mcD-Promotors im Gegensatz zur Expression unter *fdx*-Promotor-Kontrolle dazu führte, dass GvpD einen messbaren negativen Einfluss auf die Aktivität des mcA-Promotors hatte.

Der Grund für die unterschiedliche Aktivierung des mcA-Promotors durch mcA-mcD-DE und mcA/DE $^{ex}$  relativ zur Kontrolle mit mcA-*bgaH* und GvpE ist unklar, kann aber nur in der unterschiedlichen Expression der Regulatorgene zu suchen sein. Hierzu wurden mittels Northern-Analysen die *gvpDE*-mRNA-Mengen in den verschiedenen Transformanten verglichen. Mittels Western-Analysen mit Antiseren gegen GvpD und GvpE wurde auch die Menge der beiden Proteine in den Transformanten verglichen. Die Northern-Analysen zeigten, dass die Transformanten, die *gvpDE* unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors exprimierten und diejenigen, die *gvpDE* unter der Kontrolle des mcD-Promotors exprimierten, ähnliche *gvpDE*-mRNA-Mengen enthielten. Trotz der vergleichbaren Mengen an *gvpDE*-mRNA zeigten die Western-Analysen unterschiedliche GvpD- und GvpE-Proteinmengen in der mcA/DE $^{ex}$ - und der mcA-mcD-DE-Transformante. Die mcA/DE $^{ex}$ -Transformante enthielt geringere Mengen an GvpD und größere Mengen an GvpE als die mcA-mcD-DE-Transformante. Dieses Ergebnis ist sehr gut im Einklang mit der höheren Aktivierung des mcA-Promotors in der

mcA/DE<sup>ex</sup>-Transformante. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die Höhe der Aktivierung des mcA-Promotors abhängig vom Verhältnis von GvpD zu GvpE ist.

Worin aber lag der Unterschied im Verhältnis von GvpD zu GvpE bei den mcA/E<sup>ex</sup>- und den mcA-mcD-DE-Transformanten? Die Verwendung unterschiedlicher Promotoren ist unwahrscheinlich als Ursache für die unterschiedlichen GvpD/GvpE-Verhältnisse, da *gvpDE* in beiden Transformanten cotranskribiert werden. Die Ursache ist vermutlich eher in den Unterschieden bei den mRNAs zu suchen. Der *gvpDE*-mRNA in der mcA/DE<sup>ex</sup>-Transformante fehlte der 82 Nukleotide lange mRNA-*leader* von *gvpD*. Möglicherweise ist dieser mRNA-*leader* für die Stabilität des 5'-Endes der *gvpDE*-mRNA wichtig oder an der effektiven Translation von *gvpD* beteiligt und bedingt dadurch das unterschiedliche GvpD/GvpE-Verhältnis.

Um wieder auf die Frage zurückzukommen, ob GvpD direkt am mcA-Promotor wirkt und die Rekrutierung der RNA-Polymerase inhibiert, oder ob GvpD mit GvpE interagiert und so die Aktivierung des mcA-Promotors verhindert, wurde wieder eine Transformante getestet, die nur GvpD ausgehend vom mcD-Promotor produzierte. Die Analyse der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten in der mcA-mcD-D-Transformante zeigte, dass in dieser zu keinem Zeitpunkt eine messbare Aktivität vorhanden war. Da die basalen Aktivitäten der mcA-Transformante bereits sehr niedrig sind, war der Unterschied zu der mcA-mcD-D-Transformante nur sehr gering. Das Verfolgen der sichtbaren Gelbfärbung durch die Akkumulierung des o-Nitrophenolat-Anions in den Reaktionsansätzen des ONPG-Tests zeigte jedoch, dass es sich in der mcA-mcD-D-Transformante um eine signifikante Reduktion der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten handelte. Während sich die Reaktionsansätze der mcA-Transformante über Nacht gelblich verfärbten, blieben die Reaktionsansätze der mcA-mcD-D-Transformante auch nach Inkubation über Nacht farblos. Diese Ergebnisse deuteten an, dass GvpD in der Lage war, die basale mcA-Promotoraktivität zu erniedrigen und gaben einen Hinweis auf eine Wirkung von GvpD direkt am mcA-Promotor. Diese Ergebnisse waren jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen der mcA/D<sup>ex</sup>-Transformante, bei der die Anwesenheit von GvpD keine Auswirkung auf die basale Aktivität des mcA-Promotors hatte.

Zusammenfassend zeigten die *bgaH*-Reporteranalysen, dass GvpD in Transformanten, die *gvpDE* unter der Kontrolle des nativen mcD-Promotors exprimierten, einen negativen Einfluss auf die GvpE-vermittelte Aktivierung des mcA-Promotors hatte und die spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten dadurch in den mcA-mcD-DE-Transformanten deutlich niedriger als in den mcA-mcD- $\Delta$ DE-Transformanten waren. Ebenso konnte mit der mcA-mcD-D-Transformante eine negative Beeinflussung der basalen mcA-Promotoraktivität festgestellt



werden. Im Gegensatz dazu konnte mit entsprechenden Transformanten, die *gvpDE* oder *gvpD* unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors exprimierten, weder eine negative Beeinflussung der GvpE-vermittelten Aktivierung des *mcA*-Promotors, noch eine Wirkung von GvpD auf die basale Aktivität des *mcA*-Promotors festgestellt werden. Die Analysen zeigten weiterhin, dass Transformanten, die einzeln entweder nur *gvpD* oder nur *gvpE* unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors exprimierten, große Mengen der entsprechenden Proteine enthielten, während in Transformanten, die beide Gene exprimierten, nur geringe Mengen beider Proteine nachgewiesen wurden. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die beiden Proteine miteinander interagieren können und dadurch deren Degradation gefördert wird.

### 1.3. Zeitliches Auftreten von GvpD und GvpE während des Wachstums von *Hf. mediterranei*

Für die Untersuchung des zeitlichen Auftretens der Proteine GvpD und GvpE während des Wachstums von *Hf. mediterranei* wurden Zellen in Medium mit 25% Salz kultiviert, in dem *Hf. mediterranei* die *mc-vac*-Region exprimiert und in der stationären Wachstumsphase Gasvesikel produziert. Während des Wachstums wurden sieben Proben für den Nachweis von GvpD und GvpE entnommen. Gasvesikel wurden als lichtreflektierende Partikel innerhalb der Zellen von *Hf. mediterranei* unter dem Phasenkontrastmikroskop in der stationären Wachstumsphase in den Proben 5-7 detektiert. Die Detektion des Hauptstrukturproteins der Gasvesikel erfolgte mit dem GvpA-spezifischen Antiserum (Englert & Pfeifer, 1993) und war zeitlich identisch mit dem Auftreten der Gasvesikel in *Hf. mediterranei*. Der Nachweis von GvpD und GvpE wurde mit den im Rahmen dieser Arbeit generierten Antiseren durchgeführt. Mit dem GvpD-spezifischen Antiserum konnte GvpD in der stationären Wachstumsphase (Proben 5-7) nachgewiesen werden. Dies ist in guter Übereinstimmung mit dessen regulatorischer Funktion, die Gasvesikelbildung in der stationären Wachstumsphase zu limitieren. Diese Funktion wurde vor allem bei der Analyse von  $\Delta D$ -Transformanten deutlich, bei denen eine starke Überproduktion von Gasvesikeln in der stationären Wachstumsphase detektierbar war, wohingegen die Gasvesikelmenge in der entsprechend komplementierten Kontrolltransformante  $\Delta D/D^{ex}$  deutlich reduziert war (Englert *et al.*, 1992b; Pfeifer *et al.*, 2001).

Das GvpE-spezifische Antiserum detektierte GvpE ab der späten exponentiellen und während der gesamten stationären Wachstumsphase (Proben 3-7). Die nachweisbare Bildung von GvpE beginnt somit zeitlich vor der Bildung der Gasvesikel. Dies ist in guter Übereinstimmung mit dessen regulatorischer Funktion als Transkriptionsaktivator des *mcA*-

Promotors in der stationären Wachstumsphase. Die Aktivität des mcA-Promotors könnte somit allein durch die Verfügbarkeit von GvpE reguliert sein.

Die Beobachtung, dass GvpD und GvpE sich möglicherweise gegenseitig negativ beeinflussen, wäre durch das fast parallele Auftreten der beiden Proteine möglich. Dies könnte auch die geringe Menge der beiden Proteine in zellfreien Extrakten von *Hf. mediterranei* erklären, wodurch sich der Nachweis des zeitlichen Auftretens von GvpD und vor allem von GvpE als relativ schwierig erwies und andeutete, dass vor allem GvpE nur in sehr geringen Mengen in *Hf. mediterranei* vorhanden war.

Das zeitliche Auftreten von mcGvpD und mcGvpE unterscheidet sich interessanterweise von dem zeitlichen Auftreten der beiden verwandten Proteine cGvpD und cGvpE in *Hb. salinarum* PHH4. Während cGvpE ähnlich wie mcGvpE ab der exponentiellen Wachstumsphase und während der gesamten stationären Wachstumsphase nachweisbar ist, wird cGvpD nur in der frühen exponentiellen Wachstumsphase detektiert und ist in der stationären Wachstumsphase nicht mehr nachweisbar (Krüger & Pfeifer, 1996). Die Bildung von mcGvpD und cGvpD entspricht dabei jeweils der Bildung der entsprechenden *gvpD*-mRNA, die von den jeweiligen D-Promotoren aus gebildet wird. *Hf. mediterranei* bildet während der exponentiellen Wachstumsphase nur geringe Mengen verschieden langer Transkripte vom mcD-Promotor aus. In der stationären Wachstumsphase sind vom mcD-Promotor aus zwar nur noch kürzere mRNA-Fragmente nachweisbar, die maximal die Leserahmen von mc-*gvpD* und mc-*gvpE* beinhalten. Diese werden jedoch in deutlich größerer Menge gebildet, als in der exponentiellen Wachstumsphase, was die Nachweisbarkeit von mcGvpD und mcGvpE in dieser Wachstumsphase erklärt. *Hb. salinarum* PHH4 bildet hingegen vom cD-Promotor aus nur geringe Mengen einer mRNA mit *c-gvpDEFGHIJKLM* während des gesamten Wachstums. Das differentielle Auftreten von cGvpD und cGvpE in *Hb. salinarum* PHH4 lässt sich mit dem Nachweis von *antisense*-RNA's in der stationären Wachstumsphase erklären, die komplementär zur c-*gvpD*-mRNA sind und dadurch vermutlich die Translation von c-*gvpD* während der stationären Wachstumsphase verhindern (Krüger & Pfeifer, 1996). Entsprechende *antisense*-RNAs für die mc-*gvpD*-mRNA konnten in *Hf. mediterranei* jedoch nicht detektiert werden (Röder & Pfeifer, 1996).

Die Tatsache, dass mcGvpD und mcGvpE nur in der stationären Wachstumsphase nachweisbar waren, ist besonders wichtig in Bezug auf die Regulation des mcA-Promotors, da die Reprimierung der *gvpA*-mRNA-Bildung in der exponentiellen Wachstumsphase offensichtlich dadurch erreicht wird.

Die Frage der Verfügbarkeit von GvpD und GvpE läßt sich zum Teil damit beantworten, dass die entsprechenden mRNA's für GvpD und GvpE in der exponentiellen Wachstumsphase in deutlich geringeren Mengen vorhanden sind als in der stationären Wachstumsphase, was zu deutlich niedrigeren Proteinmengen führen sollte. Allerdings haben beispielsweise die *bgaH*-Reporter-gen-Analysen gezeigt, dass bereits sehr geringe Mengen an GvpE ausreichen, um den *mcA*-Promotor sehr stark zu aktivieren. Die geringeren *gvpDE*-mRNA-Mengen in der exponentiellen Wachstumsphase sind daher sicherlich nicht ausreichend, um die GvpE-vermittelte Aktivierung des *mcA*-Promotors völlig zu verhindern. Die Ergebnisse deuten vielmehr darauf hin, dass es einen weiteren Mechanismus zur Reprimierung der GvpE-vermittelten Aktivierung des *mcA*-Promotors in der exponentiellen Wachstumsphase geben muß und dass GvpD daran beteiligt ist: Untersuchungen mit  $\Delta D$ -Transformanten zeigten dazu bereits, dass in diesen die *gvpA*-mRNA-Menge nicht nur in der stationären Wachstumsphase, sondern auch in der exponentiellen Wachstumsphase erhöht war (Röder & Pfeifer, 1996). Dies zeigte, dass das Fehlen von GvpD in der exponentiellen Wachstumsphase eine Auswirkung auf die Expression am *mcA*-Promotor hatte und demnach GvpD eine Funktion bei der Reprimierung der *gvpA*-mRNA-Bildung in der exponentiellen Wachstumsphase haben muß.

Die Untersuchung der *mcA/DE<sup>ex</sup>*-Transformante gab dazu einen weiteren Hinweis, indem GvpD und GvpE sich bei gleichzeitiger Anwesenheit gegenseitig in der Menge negativ beeinflussten, wodurch die beiden Proteine in wesentlich geringeren Mengen nachweisbar waren als in Transformanten, die *gvpD* oder *gvpE* jeweils alleine exprimierten. Die gegenseitige Destabilisierung auf Proteinebene könnte sowohl die Nicht-Nachweisbarkeit der beiden Proteine als auch die Reprimierung der GvpE-abhängigen Aktivierung des *mcA*-Promotors in der exponentiellen Wachstumsphase erklären.

#### **1.4. Protein-Protein-Interaktion zwischen GvpD und GvpE**

Für die weitere Charakterisierung der Funktion von GvpD und GvpE wurde nach möglichen Bindungspartnern der beiden regulatorischen Proteine gesucht. Für diese Analysen wurden die beiden Proteine rekombinant in *E. coli* als His-tag-Fusionsproteine produziert, mittels Metallionenaffinitätschromatographie gereinigt und jeweils an eine Ni-NTA-Agarose-Matrix gebunden. Dadurch wurde eine Affinitätschromatographiematrix hergestellt, die GvpD-His bzw. GvpE-His als koordinativ gebundenen Liganden enthielt. Mit Hilfe dieser Matrices wurde versucht, Proteine aus einer Probe mit löslichen Proteinen von *Hf. mediterranei* selektiv zu binden. Proteine, die mit dem Matrix-gebundenen GvpD-His bzw. GvpE-His intera-

gierten, wurden anschließend durch entsprechend gewählte Elutionsbedingungen von der Matrix isoliert und analysiert.

Da die Aktivität und Stabilität von Proteinen aus halophilen Organismen in der Regel von hohen Salzkonzentrationen (2-5 M KCl oder NaCl) abhängig ist, wurden die aus *E. coli* unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff) gereinigten Proteine GvpD-His und GvpE-His für die Herstellung der Matrices gegen Puffer dialysiert, die zu einer Konzentration von 2,5 M KCl (18,6% w/v) in den Proteinlösungen führten. Auf diesem Wege sollte eine Rückfaltung der halophilen Proteine erfolgen. Unter diesen Bedingungen wurde bereits das TATA-Bindeprotein erfolgreich rückgefaltet (Soppa & Link, 1997). Auch die Glucose-Dehydrogenase aus *Hf. mediterranei* konnte aus einem Puffer, der 8 M Harnstoff enthielt, durch 40-fache Verdünnung und Zugabe von 2-3 M KCl oder NaCl rückgefaltet werden, was durch die Wiederherstellung der enzymatischen Aktivität gezeigt werden konnte (Pire *et al.*, 2001). Die Bindung von His-tag-Proteinen an eine Ni-NTA-Matrix ist unabhängig von der Salzkonzentration in den verwendeten Puffern (Hochuli *et al.*, 1988) und kann daher problemlos bei 2-3 M KCl durchgeführt werden. Die Methode der Affinitätschromatographie ist daher für den Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen bei hohen Salzkonzentrationen geeignet.

Mit der GvpD-His-Ni-NTA-Matrix konnte GvpE selektiv aus einem zellfreien Extrakt einer stationär gewachsenen *Hf. mediterranei*-Kultur angereichert werden. Auf die gleiche Weise konnte umgekehrt GvpD mit Hilfe einer GvpE-His-Ni-NTA-Matrix selektiv angereichert werden. Die Tatsache, dass beide regulatorischen Proteine gegenseitig aus *Hf. mediterranei* mit Hilfe der Affinitätschromatographie isoliert werden konnten, gab einen guten Hinweis darauf, dass GvpD und GvpE auch *in vivo* miteinander interagieren. Der Nachweis der Interaktion zwischen GvpD und GvpE bestätigte die Vermutung, dass die beiden Proteine sich gegenseitig beeinflussen und gab einen weiteren Hinweis auf die Regulation des mcA-Promotors. Die Funktion von GvpD bei der Reprimierung des mcA-Promotors könnte darin liegen, GvpE zu inaktivieren und dadurch die Aktivierung des mcA-Promotors zu verhindern. Diese Funktion könnte dadurch geschehen, dass GvpD den Transkriptionsaktivator GvpE bindet und dadurch sterisch dessen Funktion bei der Aktivierung des mcA-Promotors behindert oder dass die beiden Proteine durch die Bindung destabilisiert und schließlich degradiert werden. Letzteres würde die geringe Nachweisbarkeit beider Proteine erklären, wenn diese zusammen exprimiert werden. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass GvpD bei der Interaktion mit GvpE den Transkriptionsaktivator modifiziert und so dessen Aktivität beeinflusst. In diesem Zusammenhang ist vielleicht das in der abgeleiteten Aminosäuresequenz von GvpD

vorhandene *p-loop*-Motiv von Bedeutung, das ein mögliches ATP-/GTP-Bindemotiv darstellt und möglicherweise an einer Phosphorylierungsreaktion beteiligt ist. Bei der Diskussion über mögliche Regulationsmechanismen ist allerdings noch zu berücksichtigen, dass außer GvpD und GvpE noch die Anwesenheit weiterer Proteine aus der G-N-Region (*gvpDEFG-gvpACN*) für die Regulation des *mcA*-Promotors wichtig ist, wie die am Anfang dargestellten Northern-Analysen mit den ADE- und G-N-Transformanten zeigten. Wie bereits diskutiert, beeinflussen bestimmte Gene aus dieser Region vermutlich die Expression von *gvpD* oder die Menge von GvpD oder wirken bei der Repression des *mcA*-Promotors mit GvpD im Zusammenspiel.

## **2. Untersuchungen zur Charakterisierung des Einflusses von GvpF, GvpG und GvpN auf die Aktivierung und Reprimierung des *mcA*-Promotors**

Für die weitere Charakterisierung der Regulation des *mcA*-Promotors wurde in dieser Arbeit untersucht, welche der im G-N-Konstrukt vorhandenen Gene zusätzlich zu GvpD und GvpE für die Regulation der *gvpA*-mRNA-Bildung verantwortlich sind. GvpA und GvpC sind Strukturproteine und damit vermutlich nicht an der Regulation beteiligt. Kandidatengene für eine mögliche regulatorische Beteiligung bei der Reprimierung des *mcA*-Promotors waren daher vor allem GvpF, GvpG und GvpN. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von GvpF weist an Position 38-70 ein Motiv auf, das Ähnlichkeiten mit Proteinen der Sar1-Familie zeigt. Zur Sar1-Familie gehören Proteine, die in Eukaryonten an der Regulation der Ausbildung von Membranvesikeln beteiligt sind (Takai *et al.*, 2001). Sar1-Proteine können GDP und GTP binden und haben dadurch eine inaktive und eine aktive Form. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von GvpN weist ebenso wie die von GvpD ein *p-loop*-Motiv (*Walker A*-Motiv) auf, das sich von Position 91-98 erstreckt und die Sequenz GPTGCGKT hat (konservierte Aminosäuren des *p-loop*-Motivs sind unterstrichen) (Saraste *et al.*, 1990; Pfeifer *et al.*, 2001). Im Vergleich hierzu hat das *p-loop*-Motiv von GvpD die Sequenz GAPGTGKT (Position 39-46). Die abgeleitete Aminosäuresequenz von GvpG zeigt dagegen keine erkennbaren Motive, die Hinweise auf eine mögliche Funktion geben könnten. Das Protein besitzt jedoch einen hydrophoben N-terminalen Bereich und einen hydrophilen C-terminalen Bereich und es wurde daher eine mögliche strukturelle oder Chaperonfunktion bei der Gasvesikelbildung vorgeschlagen (Englert *et al.*, 1992a).

Für die Untersuchung der wachstumsphasenabhängigen Regulation der *gvpA*-mRNA-Bildung wurde mit Hilfe von Northern-Analysen der Einfluß bestimmter, in *mc-vac*-Subfragmenten zusätzlich zu *gvpDE* vorhandener Gene auf die Aktivität des *mcA*-Promotors analysiert. Zusätzlich zu den Northern-Analysen sollten mögliche regulatorische Effekte von

Gvp-Proteinen durch die Verwendung des Reportergens *bgaH* in einer quantitativeren Weise untersucht werden.

### 2.1. Northern-Analysen mit *Hf. volcanii*-Transformanten

Die Northern-Analysen mit *Hf. volcanii*-Transformanten, die die Leserahmen von GvpF, GvpG und GvpN sowohl in *cis* als auch in *trans* zusätzlich zu *gvpADE* enthielten, zeigten, dass die jeweils zusätzliche Anwesenheit von GvpF oder GvpN mit einer niedrigen *gvpA*-mRNA-Menge vor allem in der exponentiellen Wachstumsphase einherging. Diese Analysen gaben Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von GvpF und GvpN an der Regulation des *mcA*-Promotors. Transformanten, die zusätzlich GvpG enthielten, zeigten hingegen keine reduzierte *gvpA*-mRNA-Menge.

### 2.2. Reportergenanalysen mit dem *bgaH*-Gen

Die Northern-Analysen zeigten bereits, dass die Anwesenheit von *gvpF* zu niedrigeren *gvpA*-mRNA-Mengen führte. Mit dem Reportergen *bgaH* sollten diese Ergebnisse zum einen bestätigt und zum anderen genauer quantifiziert werden. Dazu wurden Transformanten hergestellt, die das *mcA-bgaH*-Konstrukt (*mcA*) und zusätzlich *gvpDEF* (*DEF<sup>ex</sup>*), *gvpEF* (*ΔDEF<sup>ex</sup>*) bzw. *gvpDEFG* (*DEFG<sup>ex</sup>*) unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors enthielten. Die spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten dieser Transformanten wurden dann sowohl mit der basalen Aktivität der *mcA*-Transformante, als auch mit den GvpE-abhängig aktivierten  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der *mcA/E<sup>ex</sup>*- und *mcA/DE<sup>ex</sup>*-Transformanten verglichen. Hier sollte vor allem untersucht werden, ob die zusätzliche Expression von *gvpF* eine niedrigere *mcA*-Promotor-abhängige  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in der *mcA/DEF<sup>ex</sup>*-Transformante verursachte, als in der *mcA/DE<sup>ex</sup>*-Transformante messbar war. In Tabelle 9 sind alle Aktivierungsfaktoren der *mcA*-Promotor-abhängigen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der untersuchten *Hf. volcanii*-Transformanten aufgelistet.

Die Analyse der *mcA/DEF<sup>ex</sup>*-Transformante zeigte im Vergleich zu den gleich hohen Aktivitäten der *mcA/E<sup>ex</sup>*- und *mcA/DE<sup>ex</sup>*-Transformanten eine 3,3-fach niedrigere Aktivierung des *mcA*-Promotors. Die Ergebnisse dieser Messungen waren damit in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Northern-Analysen mit den *F-A*- und *ADE/F<sup>ex</sup>*-Transformanten und zeigten, dass die gemeinsame Anwesenheit von GvpF und GvpD eine Verminderung der GvpE-abhängigen *mcA*-Promotor-Aktivierung verursachte.

**Tabelle 9. Aktivierungsfaktoren für die mcA-Promotor-abhängigen spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten in den *Hf. volcanii*-Transformanten**

Transformante	Einfluß der <i>gvp</i> -Gene	Faktor Aktivierung	% max. Aktivität
mcA	-	1	0,8
mcA/E <sup>ex</sup>	<i>gvpE</i>	82	100
mcA/DE <sup>ex</sup>	<i>gvpD</i> + <i>gvpE</i>	82	100
mcA/DEF <sup>ex</sup>	<i>gvpD</i> + <i>gvpE</i> + <i>gvpF</i>	26	32
mcA/DEFG <sup>ex</sup>	<i>gvpD</i> + <i>gvpE</i> + <i>gvpF</i> + <i>gvpG</i>	83	101
mcA/D <sup>ex</sup>	<i>gvpD</i>	1	0,8
mcA/F <sup>ex</sup>	<i>gvpF</i>	1	0,8
mcA/ $\Delta$ DE <sup>ex</sup>	<i>gvpE</i>	65	79
mcA/ $\Delta$ DEF <sup>ex</sup>	<i>gvpE</i> + <i>gvpF</i>	87	106
mcA/DE <sup>mcD</sup>	<i>gvpD</i> + <i>gvpE</i>	27	28
mcA-mcD-D	<i>gvpD</i>	-	0
mcA-mcD- $\Delta$ DE	<i>gvpE</i>	96	100
mcA-mcD-DE	<i>gvpD</i> + <i>gvpE</i>	26	27
mcA-mcD-DEF	<i>gvpD</i> + <i>gvpE</i> + <i>gvpF</i>	27	28
mcA-mcD- $\Delta$ DEF	<i>gvpE</i> + <i>gvpF</i>	134	139

Mit der mcA/F<sup>ex</sup>- und der mcA/ $\Delta$ DEF<sup>ex</sup>-Transformante wurde getestet, ob GvpF alleine die basale Aktivität des mcA-Promotors bzw. die GvpE-vermittelte aktivierte Aktivität des mcA-Promotors beeinflussen konnte. Die Ergebnisse dieser Analysen zeigten jedoch, dass GvpF ohne GvpD weder einen Einfluss auf die basale noch auf die durch GvpE aktivierte mcA-Promotoraktivität hatte.

Die Analyse der mcA/DEFG<sup>ex</sup>-Transformante sollte zeigen, ob die zusätzliche Anwesenheit von GvpG die mcA-Promotor-abhängige spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität beeinflussen konnte. Die Analyse der mcA/DEFG<sup>ex</sup>-Transformante zeigte im Schnitt einen ähnlichen Aktivitätsverlauf wie die mcA/E<sup>ex</sup>- bzw. mcA/DE<sup>ex</sup>-Transformanten. Dieses Ergebnis war unerwartet, da mit der mcA/DEF<sup>ex</sup>-Transformante bereits eine Reduktion der mcA-Promotoraktivität gemessen werden konnte und die mcA/DEFG<sup>ex</sup>-Transformante ebenfalls *gvpDEF* enthielt. Möglicherweise wirkt hier die Anwesenheit von GvpG konträr zu der beobachteten Fähigkeit von GvpF, zusammen mit GvpD die Aktivierung des mcA-Promotors negativ zu beeinflussen.

In einer weiteren Reihe wurde eine Transformante untersucht, die jeweils auf einem Konstrukt *mcA-bgaH* und *gvpDEF* (mcA-mcD-DEF) unter der Kontrolle des nativen mcD-Promotors enthielt. Dabei diente die mcA-Transformante wieder als Kontrolle für die basale und die mcA-mcD- $\Delta$ DE-Transformante als Kontrolle für die maximale Aktivität. Die spezifi-

schen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der mcA-mcD-DEF-Transformante waren ähnlich hoch wie diejenigen der mcA-mcD-DE-Transformante. Diese Analysen zeigten somit, dass die zusätzliche Anwesenheit von *gvpF* hier in dem Konstrukt mit dem nativen Promotorbereich mit beiden mc-vac-Promotoren keine weitere Erniedrigung der Aktivierung der mcA-Promotoraktivität zur Folge hatte und standen somit im Gegensatz zu den Analysen mit der mcA/DEF<sup>ex</sup>-Transformante.

Der Grund für die unterschiedliche Auswirkung der zusätzlichen Anwesenheit von *gvpF* war auch hier in der unterschiedlichen Expression der Konstrukte zu suchen. Western-Analysen mit einem GvpF-spezifischen Antiserum zeigten, dass GvpF in den mcA/DEF<sup>ex</sup>- und den mcA/ $\Delta$ DEF-Transformanten deutlich nachweisbar war, während die mcA-mcD-DEF-Transformante keine nachweisbaren Mengen an GvpF enthielt. Die Tatsache, dass hier kein GvpF nachweisbar war, erklärt auch das Ergebnis, dass die zusätzliche Expression von *gvpF* in diesem Konstrukt nicht zu einer weiteren Reduktion der mcA-Promotoraktivität führte.

Die spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten wurden in den durchgeführten Experimenten jeweils ab der späten exponentiellen Wachstumsphase bis zur stationären Wachstumsphase verfolgt. In der frühen exponentiellen Wachstumsphase waren die gemessenen Absorptionsänderungen im  $\beta$ -Galaktosidase-Test zu gering, um exakte spezifische Aktivitäten bestimmen zu können. Daher konnte dieser Zeitraum mit dem Reportergensystem nicht dokumentiert werden.

### **2.3. Zeitliches Auftreten von GvpF während des Wachstums von *Hf. mediterranei***

Das zeitliche Auftreten von GvpF während des Wachstums von *Hf. mediterranei* wurde mit einem im Rahmen dieser Arbeit generierten Antiserum analysiert. Während des Wachstums von *Hf. mediterranei* wurden sieben Proben für den Nachweis von GvpF entnommen. Mit dem GvpF-spezifischen Antiserum konnte GvpF vor allem in der exponentiellen Wachstumsphase (Proben 1-3) detektiert werden. In der späten exponentiellen Wachstumsphase (Proben 4 und 5) waren bereits wesentlich geringere Mengen GvpF detektierbar und in der stationären Wachstumsphase war GvpF nicht mehr nachweisbar. Diese Ergebnisse erklären die Reportergenanalysen der mcA-mcD-DEF-Transformante, bei der von der spät-exponentiellen bis zur stationären kein negativer Einfluß von GvpF auf die mcA-Promotor-Aktivität gezeigt werden konnte. Im Gegensatz dazu sorgte der *fdx*-Promotor in der mcA/DEF<sup>ex</sup>-Transformante für größere Mengen an GvpF während des gesamten Wachstums und entsprechend konnte in dieser Transformante eine verminderte mcA-Promotor-Aktivität beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigten somit, dass der negative Einfluss von GvpF auf



die mcA-Promotor-Aktivität durch dessen wachstumsphasenabhängige Bildung reguliert wird und in *Hf. mediterranei* vermutlich nur in der frühen exponentiellen Wachstumsphase eine Rolle spielt.

#### **2.4. Protein-Protein-Interaktionen mit GvpC, GvpF, GvpG und GvpN**

In den weiteren Analysen wurde mit der Methode der Affinitätschromatographie mit koordinativ gebundenen Gvp-His-Proteinen als Liganden nach Bindungspartnern für die Proteine GvpF, GvpG, GvpC und GvpN gesucht. Die Experimente mit GvpC-, GvpG- und GvpN-Ni-NTA-Matrices identifizierten keine Bindungspartner für die entsprechenden Proteine. Mit der GvpF-Matrix konnten jedoch mit dem GvpA-spezifischen Antiserum sowohl Aggregate von GvpA als auch das GvpA-Monomer in den Eluaten nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deutete an, dass GvpF und GvpA in *Hf. mediterranei* miteinander interagieren. Damit wäre GvpF ein Protein, das an der Bildung bzw. dem Aufbau der Gasvesikel beteiligt ist. Dies widerspricht zunächst einer regulatorischen Funktion des Proteins. Trotzdem konnte mit den Northern- sowie mit den Reportergen-Analysen eine Beteiligung von GvpF an der GvpD-vermittelten Repression des mcA-Promotors in der frühen exponentiellen Wachstumsphase gezeigt werden. Eine mögliche Beteiligung von GvpF sowohl an der Synthese als auch an der Regulation der Gasvesikelbildung wäre jedoch vorstellbar, wenn der Gasvesikelbildungsapparat mit der Regulation der mcA-Promotor-Aktivität verbunden wäre.

### **3. Charakterisierung von GvpD**

#### **3.1. Untersuchung von Mutanten von GvpD**

Die abgeleitete Aminosäuresequenz von GvpD zeigt drei interessante Bereiche, die für dessen Funktion wichtig sind: Nahe dem N-Terminus von GvpD befindet sich ein sogenanntes *p-loop*-Motiv (*Walker A*-Motiv, Position 36-46), das ein mögliches ATP-/GTP-Bindemotiv darstellt und für die reprimierende Funktion von Bedeutung ist, was durch die Analyse entsprechender  $\Delta D/D_{mut}^{ex}$ -Transformanten gezeigt wurde (Zotzel, 1998; Pfeifer *et al.*, 2001). Des weiteren befinden sich in der Aminosäuresequenz noch zwei basische Regionen, die mögliche DNA-Binderegionen darstellen können und von denen zumindest die erste Region (Position 201-222) wichtig für die reprimierende Wirkung von GvpD ist (Kurenbach, 1999; Pfeifer *et al.*, 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere Analysen mit *Hf. volcanii*-Transformanten durchgeführt, die veränderte *gvpD<sub>mut</sub>*-Gene trugen. Hier sollte zunächst überprüft werden, ob

alle mutagenisierten Proteine in den  $\Delta D/D_{mut}^{ex}$ -Transformanten von *Hf. volcanii* auch tatsächlich vorhanden waren und die Überexpression von Gasvesikeln in den Transformanten wirklich auf ein inaktives GvpD<sub>mut</sub>-Protein zurückzuführen war und nicht auf der Tatsache beruhte, dass dieses nicht oder in zu geringer Menge gebildet oder schneller abgebaut wurde. Für diese Analysen wurde das im Rahmen dieser Arbeit generierte Antiserum gegen GvpD-His verwendet. In entsprechenden Western-Analysen konnte gezeigt werden, dass alle *Hf. volcanii*-Transformanten mit den *gvpD<sub>mut</sub>*-Genen die jeweiligen GvpD<sub>mut</sub>-Proteine produzierten und die Überproduktion von Gasvesikeln in den entsprechenden  $\Delta D/D_{mut}^{ex}$ -Transformanten auf ein gebildetes, aber inaktives GvpD-Protein zurückzuführen ist.

In weiteren Analysen wurde die Wirkung von GvpD und der verschiedenen GvpD<sub>mut</sub>-Proteine auf die Aktivität des mcA-Promotors untersucht. Mit der  $\Delta DE/D^{ex}$ -Transformante konnte bereits gezeigt werden, dass GvpD einen negativen Einfluß auf die mcA-Promotoraktivität hatte. Die Reportergenanalysen mit dem *bgaH*-Gen bestätigten ebenfalls, dass GvpD in der Lage war, sowohl die basale mcA-Promotor-Aktivität als auch die GvpE-vermittelte Aktivierung des mcA-Promotors zu beeinflussen. Mit *Hf. volcanii*-Transformanten, die GvpD<sub>mut</sub>-Proteine produzierten, die Veränderungen im *p-loop*-Motiv oder den beiden basischen Regionen trugen, wurde deren Bedeutung bei der Repression der GvpE-vermittelten Aktivierung des mcA-Promotors untersucht. Die Detektion der *gvpA*-mRNA in diesen Transformanten zeigte, dass die oben genannten Motive wichtig für die Funktion von GvpD waren, die GvpE-vermittelte Aktivierung des mcA-Promotors zu verhindern: Die Analyse der  $\Delta D/D_{mut}^{ex}$ -Transformanten, die Aminosäure-Austausche an konservierten Positionen innerhalb des *p-loop*-Motivs hatten, zeigte, dass diese Transformanten relativ große Mengen an *gvpA*-mRNA während des gesamten Wachstums bildeten. Die Ergebnisse der Northern-Analysen deckten sich somit, wie erwartet, mit den Ergebnissen der phänotypischen Charakterisierung der *p-loop*-Mutanten und zeigten, dass das *p-loop*-Motiv im GvpD wichtig für dessen Funktion bei der Reprimierung der *gvpA*-mRNA-Bildung ist.

Im Gegensatz zu den  $\Delta D/D_{mut}^{ex}$ -Transformanten mit Veränderungen im *p-loop*-Motiv enthielten die  $\Delta D/D_{mut}^{ex}$ -Transformanten mit Aminosäure-Austauschen innerhalb der beiden basischen Regionen von GvpD große *gvpA*-mRNA-Mengen nur während der stationären Wachstumsphase, wohingegen die Expression am mcA-Promotor in der exponentiellen Wachstumsphase reduziert war.

Diese Ergebnisse deuteten an, dass sich die Funktion von GvpD möglicherweise bei der Regulation der mcA-Promotoraktivität in der exponentiellen Wachstumsphase von derjenigen in der stationären Wachstumsphase unterscheidet. Das spiegelt auch die physiologisch sicht-

bare Regulation der Gasvesikelbildung wider. Während der exponentiellen Wachstumsphase wird die Gasvesikelbildung völlig reprimiert, wohingegen die Gasvesikelbildung in der stationären Wachstumsphase „erlaubt“ ist, aber auch in dieser Phase des Wachstums durch GvpD kontrolliert wird, wodurch die Anzahl der vorhandenen Gasvesikel limitiert ist. Dies wird vor allem dadurch deutlich, dass die  $\Delta D$ -Transformante und einige  $\Delta D/D_{mut}^{ex}$ -Transformanten, nicht nur in der exponentiellen Wachstumsphase unfähig sind, die *gvpA*-mRNA-Bildung zu reprimieren, sondern vor allem in der stationären Wachstumsphase eine deutliche Überproduktion an *gvpA*-mRNA und Gasvesikeln zeigen. Ein wichtiger Punkt bei der Regulation des *mcA*-Promotors ist deshalb vermutlich die Unterscheidung von exponentieller und stationärer Wachstumsphase und damit die Unterscheidung, ob die *gvpA*-mRNA-Bildung am *mcA*-Promotor völlig verhindert oder nur limitiert werden soll. An der Unterscheidung von exponentieller und stationärer Wachstumsphase könnte bei Halobakterien das Auftreten multipler *tbp*- und *tfb*-Gene eine Rolle spielen, da beispielsweise bei *Hf. volcanii* TFB2 und TBP6 nur in der frühen exponentiellen Wachstumsphase, TFB1 und TBP5 nur in der späten exponentiellen Wachstumsphase und TFB3 und TBP1-3 nur in der stationären Wachstumsphase auftreten (Charles Daniels, persönliche Mitteilung). Die wachstumsphasenabhängige Interaktion von GvpE bzw. GvpD mit unterschiedlichen TFB- und TBP-Proteinen könnte dabei an der wachstumsphasenabhängigen Aktivität des *mcA*-Promotors beteiligt sein.

### 3.2. Nachweis der möglichen ATP-/GTP-Bindung von GvpD

Da die Untersuchungen der  $\Delta D/D_{mut}^{ex}$ -Transformanten mit Aminosäureaustauschen im *p-loop*-Motiv von GvpD zeigten, dass diese putative ATP-/GTP-Bindestelle wichtig für die repressorische Funktion von GvpD ist, war es von Interesse, die ATP-/GTP-Bindefunktion an dem gereinigten GvpD-Protein zu testen.

Für diesen Nachweis wurde das in *E. coli* produzierte und aufgereinigte GvpD-His-Protein schrittweise gegen salzhaltige Puffer dialysiert, bis zu einer Konzentration von 2,5 M KCl. GvpD-His wurde anschließend an eine Ni-NTA-Matrix gebunden und mit einem ATP- bzw. GTP-haltigen Puffer inkubiert. Die Methode der Affinitätschromatographie mit GvpD-His als gebundenem Liganden stellte auch hier wieder eine Methode dar, die die Analyse einer ATP-bindenden Funktion bei den hohen Salzkonzentrationen von 2,5 M KCl in den verwendeten Puffern ermöglichte.

Mit Hilfe der GvpD-His-Ni-NTA-Matrix konnte ATP aus einem ATP-haltigen Puffer gebunden werden und war mittels hochauflösende Dünnschichtchromatographie in den Eluaten nachweisbar. In einem Kontrollexperiment mit reiner Ni-NTA konnte keine ATP-Bindung

gezeigt werden. Ebenso konnte in einem analogen Experiment keine Bindung von GTP durch eine GvpD-His-Ni-NTA-Matrix nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse gaben einen Hinweis darauf, dass das *p-loop*-Motiv tatsächlich wichtig für die Bindung von ATP sein könnte. Für die Funktion von GvpD könnte dies bedeuten, dass das Protein eine energieabhängige Reaktion katalysiert, ATP für eine Phosphorylierungsreaktion verwendet oder die Bindung von ATP eine strukturelle Veränderung hervorruft, die für dessen Funktion wichtig ist.

#### 4. Abschließende Betrachtung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass GvpD als Repressor wirkt und eine negative Auswirkung auf die GvpE-vermittelte Aktivierung des *mcA*-Promotors hat. Die beiden regulatorischen Proteine GvpD und GvpE sind erst spät während des Wachstums von *Hf. mediterranei* nachweisbar und zeigen *in vitro* die Fähigkeit, miteinander zu interagieren. Die Analyse von GvpD zeigte, dass für dessen repressorische Wirkung ein *p-loop*-Motiv nahe des N-Terminus sowie eine basische Region (Position 201-222) wichtig sind. Untersuchungen mit dem gereinigtem Protein unterstützten die Hypothese, dass GvpD ATP binden kann. Da GvpD mit GvpE interagieren kann, könnte eine mögliche Funktion von GvpD darin liegen, GvpE zu phosphorylieren und auf diese Weise dessen Aktivatorfunktion negativ zu beeinflussen. Eine weitere Funktion von GvpD könnte darin liegen, dass die Interaktion mit GvpE zu einer Destabilisierung des Transkriptionsaktivators und schließlich zu dessen Degradierung führt. Dabei könnte die Bindung von ATP auch für die Interaktion von GvpD und GvpE eine Rolle spielen. Weitere *in vitro*-Analysen mit den gereinigten Proteinen könnten dazu beitragen, die Art und Weise der gegenseitigen Beeinflussung näher zu charakterisieren. Sowohl von mcGvpD aus *Hf. mediterranei* als auch von cGvpE aus *Hb. salinarum* wurden Varianten hergestellt, die Veränderungen an funktionell wichtigen Motiven innerhalb der abgeleiteten Aminosäuresequenz enthielten (Zotzel, 1998; Kurenbach, 1999; Plößer & Pfeifer, 2002). Die rekombinante Expression dieser Varianten als His-tag-Fusionsproteine in *E. coli* und deren Aufreinigung mittels Metallionenaffinitätschromatographie könnte verschiedene Varianten für die Untersuchung der gegenseitigen Beeinflussung von GvpD und GvpE liefern. Des weiteren wäre es auch interessant, zu untersuchen, ob die Interaktion von GvpD und GvpE mit der DNA-Sequenz der *mcA*-Promotor-Region assoziiert ist oder unabhängig von dieser stattfindet. Da die Protein-Protein-Interaktionsexperimente dieser Arbeit jeweils mit zellfreien Extrakten von *Hf. mediterranei* durchgeführt wurden, die auch DNA enthielten, wäre dies durchaus in den durchgeführten Experimenten möglich gewesen.

Die funktionelle Beteiligung von GvpF an der Gasvesikelbildung bleibt noch unklar. Zum einen konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von GvpF zusammen mit GvpD sich negativ auf die Aktivierung des mcA-Promotors auswirkte. Zum anderen konnte eine Interaktion von GvpF mit Aggregaten von GvpA gezeigt werden, was für eine Funktion bei der Gasvesikelbildung oder der Gasvesikelstruktur spricht. Für die Aufklärung der genauen Funktion von GvpF sind daher weitere Analysen notwendig. Für die Untersuchung sowohl des Regulationsapparats als auch des Syntheseapparats der Gasvesikelbildung könnte dazu die Detektion weiterer Protein-Protein-Interaktionen zwischen Gvp-Proteinen hilfreich sein.

# Literaturverzeichnis

- Aravind L & Koonin EV (1999).** DNA-binding proteins and evolution of transcription regulation in the archaea. *Nucleic Acids Res* 27: 4658-4670
- Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1998).** Current protocols in molecular biology, Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York
- Baliga NS & DasSarma S (2000).** Saturation mutagenesis of the haloarchaeal bop gene promoter: identification of DNA supercoiling sensitivity sites and absence of TFB recognition element and UAS enhancer activity. *Mol Microbiol* 36: 1175-1183
- Bell SD & Jackson SP (1998).** Transcription and translation in Archaea: a mosaic of eukaryal and bacterial features. *Trends Microbiol* 6: 222-228
- Bell SD, Jaxel C, Nadal M, Kosa PF, Jackson SP (1998).** Temperature, template topology, and factor requirements of archaeal transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15218-15222
- Bell SD, Kosa PF, Sigler PB, Jackson SP (1999a).** Orientation of transcription preinitiation complex in Archaea. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13662-13667
- Bell SD, Cairns SS, Robson RL, Jackson SP (1999b).** Transcription Regulation of an Archaeal Operon In Vivo and In Vitro. *Molecular Cell* 4: 971-982
- Bell SD & Jackson SP (2000a).** The Role of Transcription Factor B in Transcription Initiation and Promotor Clearance in the Archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *J Biol Chem* 275: 12934-12940
- Bell SD & Jackson SP (2000b).** Mechanism of Autoregulation by an Archaeal Transcriptional Repressor. *J Biol Chem* 275: 31624-31629
- Bell SD, Jackson SP (2001).** Mechanism and regulation of transcription in archaea. *Curr Opin Microbiol* 4: 208-213
- Bell SD, Brinkmann AB, van der Oost J, Jackson SP (2001b).** The archaeal TFIIIE $\alpha$  homologue facilitates transcription initiation by enhancing TATA-box recognition. *EMBO reports* 2: 133-138
- Bell SD, Botting CH, Wardleworth BN, Jackson SP, White MF (2002).** The interaction of Alba, a Conserved Archaeal Chromatin Protein, with Sir2 and Its Regulation by Acetylation. *Science* 296: 148-151
- Beard SJ, Hayes PK, Pfeifer F, Walsby AE (2002).** The sequence of the major gas vesicle protein, GvpA, influences the width and strength of halobacterial gas vesicles. *FEMS Microbiol Lett* 213: 149-157
- Best A (2000).** Molekulare Funktionsanalyse des gasvesikelassoziierten GvpC-Proteins aus *Halobacterium salinarum* PHH1. Wissenschaftliche Hausarbeit, TU Darmstadt
- Brinkman AB, Dahlke I, Tuiniga JE, Lammers T, Dumay V, de Heus E, Lebbink JH, Thomm M, de Vos WM, van der Oost J (2000).** An Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus* is negatively autoregulated. *J Biol Chem* 275: 38160-38169
- Brinkman AB, Bell SD, Lebbink RJ, de Vos WM, van der Oost J (2002).** The *Sulfolobus solfataricus* Lrp-like protein LysM regulates lysine biosynthesis in response to lysine availability. *J Biol Chem* 277: 29537-29549
- Brown AD (1990).** Microbial water stress physiology. Principles and perspectives. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK
- Bullock, WO, Fernandez JM, Cline SW, Doolittle WF (1987).** XL-1 Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5: 376-379
- Buchholz BEE, Hayes PK, Walsby AE (1993).** The distribution of the outer gas vesicle protein, GvpC, on the *Anabaena* gas vesicle, and its ratio to GvpA. *J Gen Microbiol* 139: 2353-2363
- Bult CJ, White O, Olsen GJ, Zhou L, Fleischmann RD, Sutton GG, Blake JA, FitzGerald LM, Clayton RA, Gocayne JD, Kerlavage AR, Dougherty BA, Tomb JF, Adams MD, Reich CI, Overbeek R, Kirkness EF, Weinstock KG, Merriam JM, Glodek A, Scott JL, Geoghagen NS, Venter JC (1996).** Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273: 1058-1073
- Calvo JM, Matthews RG (1994).** The leucine regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 58: 466-490
- Charlier D, Roovers M, Thia-Toong TL, Durbecq V, Glansdorff N (1997).** Cloning and identification of the *Sulfolobus solfataricus* lrp gene encoding an archaeal homologue of the eubacterial leucine-responsive global transcriptional regulator Lrp. *Gene*. 1997 201(1-2): 63-8
- Chomczynski P, Sacchi N (1987).** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159
- Cline SW & Doolittle WF (1987).** Efficient Transfection of the archaeobacterium *Halobacterium halobium*. *J Bacteriol* 169: 1341-1344
- Cline SW, Schalkwyk L, Doolittle WF (1989).** Transformation of the archaeobacterium *Halobium volcanii* with genomic DNA. *J Bacteriol* 171: 4987-4991

- Cooper BP, Trüper HG (1979).** Improved synthesis and rapid isolation of millimole quantities of adenylyl-sulfate. *Z Naturforsch* 34c: 346-349
- Dennis PP & Shimmin LC (1997).** Evolutionary Divergence and Salinity-Mediated Selection in Halophilic Archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 90-104
- Duschl A, Wagner G (1986).** Primary and secondary chloride transport in *Halobacterium halobium*. *J Bacteriol* 168: 548-552
- Dym O, Mevarech M, Sussman JL (1995).** Structural Features That Stabilize Halophilic Malate Dehydrogenase from an Archaeobacterium. *Science* 267: 1344-1346
- DasSarma S, Arora P, Lin F, Molinari E, Yin LR (1994).** Wild-type gas vesicle formation requires at least ten genes in the gvp gene cluster of *Halobacterium halobium* plasmid pNRC100. *J Bacteriol* 176: 7646-7652
- Ellenberger TE, Brandl CJ, Struhl K, Harrison SC (1992).** The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted alpha helices: crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell* 71: 1223-1237
- Englert C, Horne M, Pfeifer F (1990).** Expression of the major gas vesicle protein in the halophilic archaeobacterium *Haloferax mediterranei* is modulated by salt. *Mol Gen Genet* 222: 225-232
- Englert C, Krüger K, Offner S, Pfeifer F (1992a).** Three different but related gene cluster encoding gas vesicles in halophilic archaea. *J Mol Biol* 227: 586-592
- Englert C, Wanner G, Pfeifer F (1992b).** Functional analysis of the gas-vesicle gene cluster of the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei* defines the vac-region boundary and suggests a regulatory role for the *gvpD* gene or its product. *Mol Microbiol* 6: 3543-3550
- Englert C, Pfeifer F (1993).** Analysis of gas vesicle gene expression in *Haloferax mediterranei* reveals that GvpA and GvpC are both gas vesicle structural proteins. *J Biol Chem* 268: 9329-9336
- Eisenberg H, Mevarech M, Zaccai G (1992).** Biochemical, Structural and Molecular Genetic Aspects of Halophilism. *Adv Protein Chem* 43: 1-62
- Enoru-Eta J, Gigot D, Thia-Toong TL, Glansdorf N, Charlier D (2000).** Purification and characterization of Sa-Lrp, a DNA-binding protein from the extreme thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius* homologous to the bacterial global transcription regulator Lrp. *J Bacteriol* 182: 3661-3672
- Frolow F, Harel M, Sussman JL, Mevarech M, Shoham M (1996).** Insights into protein adaptation to a saturated salt environment from the crystal structure of a halophilic 2Fe-2S ferredoxin. *Nat Struct Biol* 3: 452-458
- Grant WD, Gemmell RT, McGenity TJ (1998).** Halobacteria: the evidence for longevity. *Extremophiles* 2: 279-287
- Grant WD & Larsen H (1989).** Extremely halophilic archaeobacteria, order Halobacteriales ord. Nov., in Staley JT, Bryant MP, Pfennig N, Holt JG, Ed., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.3 Williams & Wilkins, Baltimore: 2216-2233
- Gregor D (2002).** Untersuchungen zur Regulation von Promotoren aus halophilen Archaea mit dem *bgaH*-Reporter-gen. Dissertation, TU Darmstadt
- Gregor D & Pfeifer F (2001).** Use of a halobacterial *bgaH* reporter gene to analyse the regulation of gene expression in halophilic archaea. *Microbiology* 147: 1745-1754
- Gutierrez MC, Kamekura M, Holmes ML, Dyal-Smith ML, Ventosa A (2002).** Taxonomic characterization of *Haloferax* sp. ("*H. alicantei*") strain Aa 2.2: description of *Haloferax lucentensis* sp. nov. *Extremophiles* 6: 479-483
- Hain J, Reiter WD, Hudepohl U, Zillig W (1992).** Elements of an archaeal promoter defined by mutational analysis. *Nucleic Acids Research* 20: 5423-5428
- Hanahan D (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580
- Hanzelka BL, Darcy TJ, Reeve JN (2001).** TFE, an Archaeal Transcription Factor in *Methanobacterium thermoautotrophicum* Related to Eukaryal Transcription Factor TFIIE $\alpha$ . *J Bacteriol* 183: 1813-1818
- Hausner W, Thomm M (1993).** Purification and characterization of a general transcription factor, aTFB, from the archaeon *Methanococcus thermolithotrophicus*. *J Biol Chem* 268: 24047-24052
- Hausner W, Lange U, Musfeldt, (2000).** Transcription Factor S, a Cleavage Induction Factor of the Archaeal RNA Polymerase. *J Biol Chem* 275: 12393-12399
- Hayes PK, Buchholz B, Walsby AE (1992).** Gas vesicles are strengthened by the outer-surface protein, GvpC. *Arch Microbiol* 157: 229-234
- Hethke C, Geerling AC, Hausner W, de Vos WM, Thomm M (1996).** A cell-free transcription system for the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Nucleic Acids Res* 24: 2369-2376
- Hochheimer A, Hedderich R, Thauer RK (1999).** The DNA binding protein Tfx from *Methanobacterium thermoautotrophicum*: structure, DNA-binding properties and transcriptional regulation. *Mol Microbiol* 31(2): 641-650
- Hochuli E, Bannwarth W, Dobeli H, Gentz R, Stüber D (1988).** Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate absorbent. *BioTechnology* 6: 1321-1325

- Hofacker A (2002).** Regulation der Gasvesikelbildung bei *Halobacterium salinarum* PHH1. Dissertation, TU-Darmstadt
- Holmes ML, Nuttall SD, Dyll-Smith ML (1991).** Construction and use of halobacterial shuttle vectors and further studies on *Haloferax* DNA gyrase. *J Bacteriol* 12: 3807-3813
- Holmes ML, Scopes RK, Moritz RL, Simpson RJ, Englert C, Pfeifer F, Dyll-Smith ML (1997).** Purification and analysis of an extremely halophilic  $\beta$ -galactosidase from *Haloferax alicantei*. *Biochim Biophys Acta* 1337: 276-386
- Holmes ML & Dyll-Smith ML (2000).** Sequence and expression of a halobacterial  $\beta$ -galactosidase gene. *Mol Microbiol* 36: 114-122
- Horne M, Englert C, Pfeifer F (1988).** Two genes encoding gas vacuole proteins in *Halobacterium halobium*. *Mol Gen Genet* 213: 459-64
- Horne M & Pfeifer F (1989).** Expression of two gas vacuole protein genes in *Halobacterium halobium* and other related species. *Mol Gen Genet* 218: 437-444
- Horne M, Englert C, Wimmer C, Pfeifer F (1991).** A DNA region of 9 kbp contains all genes necessary for gas vesicle synthesis in halophilic archaeobacteria. *Mol Microbiol* 5: 1159-1174
- Holt J, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST (1994).** *Bergey's manual of determinative biology*. Williams and Wilkins.
- Jäger A, Samorski R, Pfeifer F, Klug G (2002).** Individual *gvp* transcript segments in *Haloferax mediterranei* exhibit varying half-lives, which are differentially affected by salt concentration and growth phase. *Nucleic Acids Res* 30(24): 5436-5443
- Jones JG, Young DC, DasSarma S (1991).** Structure and organization of the gas vesicle gene cluster on the *Halobacterium halobium* plasmid pNRC100. *Gene* 102: 117-122
- Kamekura M, Dyll-Smith ML, Upasani V, Ventosa A, Kates M (1997).** Diversity of alkaliphilic halobacteria: proposals for transfer of *Natronobacterium vacuolatum*, *Natronobacterium magadii*, and *Natronobacterium pharaonis* to *Halorubrum*, *Natrialba*, and *Natronomonas* gen. nov., respectively, as *Halorubrum vacuolatum* comb. nov., *Natrialba magadii* comb. nov., and *Natronomonas pharaonis* comb. nov., respectively. *Int J Syst Bacteriol* 47: 853-857
- Kamekura M (1998).** Diversity of extremely halophilic bacteria. *Extremophiles* 2(3):289-95
- Kanemaki M, Makino Y, Yoshida T, Kishimoto T, Koga A, Yamamoto K, Yamamoto M, Moncollin V, Egly JM, Muramatsu M, Tamura T (1997).** Molecular cloning of a rat 49-kDa TBP-interacting protein (TIP49) that is highly homologous to the bacterial RuvB. *Biochem Biophys Res Commun* 235: 64-68
- Kawarabayasi Y, Sawada M, Horikawa H, Hainaka Y, Hino Y, Yamamoto S, Sekine M, Baba S, Kosugi H, Hosoyama A, Nagai Y, Sakai M, Ogura K, Otsuka R, Nakazawa H, Takamiya M, Ohfuku Y, Funahashi T, Tanaka T, Kudoh Y, Yamazaki J, Kushida N, Oguchi A, Aoki K, Kikuchi H (1998).** Complete sequence and gene organization of the genome of a hyper-thermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3. *DNA Res* 5: 55-76
- Kawarabayasi Y, Hino Y, Horikawa H, Jin-no K, Takahashi M, Sekine M, Baba S, Ankai A, Kosugi H, Hosoyama A, Fukui S, Nagai Y, Nishijima K, Otsuka R, Nakazawa H, Takamiya M, Kato Y, Yoshizawa T, Tanaka T, Kudoh Y, Yamazaki J, Kushida N, Oguchi A, Aoki K, Masuda S, Yanagii M, Nishimura M, Yamagishi A, Oshima T, Kikuchi H (2001).** Complete genome sequence of an aerobic thermoacidophilic crenarchaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *DNA Res* 31: 123-40
- Kelly DP, Wood AP (1994).** Enzymes involved in microbiological oxidation of thiosulfate and polythionates. *Methods Enzymol* 243: 501-510
- Klenk HP, Clayton RA, Tomb JF, White O, Nelson KE, Ketchum KA, Dodson RJ, Gwinn M, Hickey EK, Peterson JD, Richardson DL, Kervlavage AR, Graham DE, Kyrpides NC, Fleischmann RD, Quackenbush J, Lee NH, Sutton GG, Gill S, Kirkness EF, Dougherty BA, McKenney K, Adams MD, Loftus B, Venter JC, et al. (1997).** The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* 390: 364-70
- Kosa PF, Gourishankar G, DeDecker BS, Sigler PB (1997).** The 2.1-Å crystal structure of an archaeal preinitiation complex: TATA-box-binding protein / transcription factor (II)B core / TATA-box. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6042-6047
- Krüger K & Pfeifer F (1996).** Transcript analysis of the c-vac region, and differential synthesis of the two regulatory gas-vesicle proteins GvpD and GvpE in *Halobacterium salinarum* PHH4. *J Bacteriol* 178: 4012-4019
- Krüger K, Hermann T, Armbruster V, Pfeifer F (1998).** The Transcriptional Activator GvpE for the Halobacterial Gas Vesicle Genes Resembles a Basic Region Leucine-zipper Regulatory Protein. *J Mol Biol* 279: 761-771
- Kurenbach B (1999).** Untersuchungen zur Regulation der Gasvesikelbildung bei dem halophilen Archaeon *Haloferax mediterranei*: gerichtete Mutagenese von *mc-gvpD*. Diplomarbeit, TU Darmstadt
- Lam W L & Doolittle W F (1989).** Shuttle vectors for the archaeobacterium *Halobacterium volcanii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5478-5482
- Langer D, Zillig W (1993).** Putative tflIS gene of *Sulfolobus acidocaldarius* encoding an archaeal transcription elongation factor is situated directly



- downstream of the gene for a small subunit of DNA-dependent RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 21: 2251
- Langer D, Hain J, Thuriaux P, Zillig W (1995).** Transcription in archaea: similarity to that in eucarya. *PNAS* 92(13): 5768-5772
- Lanyi JK (1974).** Salt-Dependent Properties of Proteins from Extremely Halophilic Bacteria *Bacteriol Rev* 38: 272-290
- Leonard PM, Smiths SH, Sedelnikova SE, Brinkman AB, de Vos WM, van der Oost J, Rice DW, Rafferty JB (2001).** Crystal structure of the Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus*. *EMBO J* 20: 990-997
- Littlefield O, Korkhin Y, Sigler PB (1999).** The structural basis for the oriented assembly of a TBP/TFB/promoter complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13668-13673
- Madigan & Oren (1999).** Thermophilic and halophilic extremophiles. *Current Opinion in Microbiology* 2: 265-269
- Mayr A & Pfeifer F (1997).** The characterization of the *nv-gvpACNOFGH* gene cluster involved in gas vesicle synthesis in *Natronobacterium vacuolatum*. *Arch Microbiol* 168: 24-32
- Meury J, Kohiyama M (1989).** ATP is required for K<sup>+</sup> active transport in the archaebacterium *Haloferax volcanii*. *Arch Microbiol* 151: 530-536
- Mullakhanbhai MF, Larsen H (1975).** *Halobacterium volcanii* spec. nov., a Dead Sea halobacterium with a moderate salt requirement. *Arch Microbiol* 104: 207-214
- Mwatha WE & Grant WD (1993).** *Natronobacterium vacuolata* sp. nov., a haloalkaliphilic archaeon isolated from Lake Magadii, Kenya. *Int J System Bacteriol* 43: 401-404
- Napoli A, van der Oost J, Sensen CW, Charlebois RL, Rossi M, Ciaramella M (1999).** An Lrp-Like Protein of the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus* Which Binds to Its Own Promotor *J Bacteriol* 181: 1474-1480
- Ng WV, Ciufu S, Smith T, Bumgarner E, Baskin D, Faust J, Dall B, Loretz C, Seto J, Slagel J, Hood L, DasSarma S (1998).** Snapshot of a large dynamic replicon in a halophilic archaeon: Megaplasmid or minichromosome? *Genome Res* 8: 1131-1141
- Ng WV, Kennedy SP, Mahairas GG, Berquist B, Pan M, Shukla HD, Lasky SR, Baliga NS, Thorsson V, Sbrogna J, Swartzell S, Weir D, Hall J, Dahl TA, Welti R, Goo YA, Leithauser B, Keller K, Cruz R, Danson MJ, Hough DW, Maddocks DG, Jablonski PE, Krebs MP, Angevine CM, Dale H, Isenbarger TA, Peck RF, Pohlschroder M, Spudich JL, Jung KW, Alam M, Freitas T, Hou S, Daniels CJ, Dennis PP, Omer AD, Ebhardt H, Lowe TM, Liang P, Riley M, Hood L, DasSarma S (2000).** Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 24: 12176-12181
- Norton CF (1992).** Rediscovering the Ecology of Halobacteria. *ASM News* 58: 363-367
- Offner S & Pfeifer F. (1995).** Complementation studies with the gas vesicle-encoding p-vac region of *Halobacterium salinarum* PHH1 reveal a regulatory role for the p-gvpDE genes. *Mol Microbiol* 16: 9-19
- Offner S, Wanner G, Pfeifer F (1996).** Functional studies of the *gvpACNO* operon of *Halobacterium salinarum* PHH1 reveal that the GvpC protein shapes gas vesicles. *J Bacteriol* 178: 2071-2078
- Offner S, Ziese U, Wanner G, Typke D, Pfeifer F (1998).** Structural characteristics of halobacterial gas vesicles. *Microbiology* 144: 1331-1342
- Offner S, Hofacker A, Wanner G, Pfeifer F (2000).** Eight of Fourteen *gvp* Genes Are Sufficient for Formation of Gas Vesicles in Halophilic Archaea. *J Bacteriol* 182: 4328-4336
- Oren A (1994).** The ecology of the extremely halophilic *FEMS Microbiol Rev* 13: 415-440
- Oren A (1999).** Bioenergetic Aspects of Halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 334-348
- Oren A (2002).** Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* 28: 56-63
- Pabo CO, Sauer RT (1992).** Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem* 61: 1053-1095
- Palmer BR, Marinus MG (1994).** The dam and dcm strains of *Escherichia coli*--a review. *Gene* 143: 1-12
- Patenge N, Haase A, Bolhuis H, Oesterheldt D (2000).** The gene for halophilic  $\beta$ -galactosidase (*bgaH*) of *Haloferax alicantei* as a reporter gene for promotor analyses in *Halobacterium salinarum*. *Mol Microbiol* 36: 105-113
- Pfeifer F, Griffing J, Oesterheldt D (1993).** The *fdx* gene encoding the [2Fe-2S] ferredoxin of *Halobacterium salinarum* (*H. halobium*). *Mol Gen Genet* 239: 66-71
- Pfeifer F, Ghahraman P (1993).** Plasmid pHH1 of *Halobacterium salinarum*: characterization of the replicon region, the gas vesicle gene cluster and insertion elements. *Mol Gen Genet* 238: 193-200
- Pfeifer F, Offner S, Krüger K, Ghahraman P, Englert C (1994).** Transformation of halophilic archaea and investigation of gas-vesicle synthesis. *Syst Appl Microbiol* 16: 569-577
- Pfeifer F, Krüger K, Röder R, Mayr A, Ziesche S, Offner S (1997).** Gas vesicle formation in halophilic archaea. *Arch Microbiol* 167: 259-268
- Pfeifer F, Zotzel J, Kurenbach B, Röder R, Zimmermann P (2001).** A p-loop motif and two basic regions in the regulatory protein GvpD are

important for the repression of gas vesicle formation in the archaeon *Haloflex mediterranei*. *Microbiology* 147: 63-73

**Pfeifer F, Gregor D, Hofacker A, Plöber P, Zimmermann P (2002).** Regulation of Gas Vesicle Formation in Halophilic Archaea. *J Mol Microbiol Biotechnol* 4: 175-181

**Pire C, Esclapez J, Ferrer J, Bonete MJ (2001).** Heterologous overexpression of glucose dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloflex mediterranei*, an enzyme of the medium chain dehydrogenase/reductase family. *FEMS Lett* 200: 221-227

**Plöber P & Pfeifer F (2002).** A bZIP protein from halophilic archaea: structural features and dimer formation of cGvpE from *Halobacterium salinarum*. *Mol Microbiol* 45: 511-520

**Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G (1975).** Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258: 598-599

**Qureshi SA, Bell SD, Jackson SP (1997).** Factor requirements for transcription in the Archaeon *Sulfolobus shibatae*. *EMBO J* 16: 2927-2936

**Qureshi SA & Jackson SP (1998).** Sequence-Specific DNA Binding by the *S. shibatae* TFIIB Homolog, TFB, and Its Effect on Promotor Strength. *Molecular Cell* 1: 389-400

**Reeve JN, Sandman K, Daniels CJ (1997).** Archaeal Histones, Nucleosomes, and Transcription Initiation. *Cell* 89: 999-1002

**Reiter WD, Hüdepohl U, Zillig W (1990).** Mutational analysis of an archaeobacterial promoter: Essential role of a TATA box for transcription efficiency and start-site selection *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9509-9513

**Rodriguez-Valera F, Ruiz-Berraquero F, Ramos-Cormenzana A (1980).** Isolation of extremely halophilic bacteria able to grow in defined inorganic media with single carbon sources. *J Gen Microbiol* 119: 535-538

**Rodriguez-Valera F, Juez G, Kushner D (1983).** *Halobacterium mediterranei* spec. nov., a new carbohydrate-utilizing extreme halophile. *Sys Appl Microbiol* 4: 369-381

**Röder R & Pfeifer F (1996).** Influence of salt on the transcription of the gas-vesicle genes of *Haloflex mediterranei* and identification of the endogenous transcriptional activator gene. *Microbiology* 142: 1715-1723

**Röder R (1997).** Untersuchungen zur genetischen Regulation der Gasvesikelbildung bei dem halophilen Archaeon *Haloflex mediterranei*. Dissertation, TU Darmstadt

**Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA

with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-494

**Sambrook & Russell (2001).** Molecular Cloning A LABORATORY MANUAL. Third Edition Cold Spring Harbor, New York

**Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467

**Saraste M, Sibbald PR, Wittinghofer A (1990).** The p-loop - a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 15: 430-434

**Schägger H, von Jagow G (1987).** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166: 368-379

**Shear H & Walsby AE (1975).** An investigation into the possible light-shielding role of gas vacuoles in a planktonic blue-green algae. *Br Phycol J* 10: 241-251

**She Q, Singh RK, Confalonieri F, Zivanovic Y, Allard G, Awayez MJ, Chan-Weiher CC, Clausen IG, Curtis BA, De Moors A, Erauso G, Fletcher C, Gordon PM, Heikamp-de Jong I, Jeffries AC, Kozera CJ, Medina N, Peng X, Thi-Ngoc HP, Redder P, Schenk ME, Theriault C, Tolstrup N, Charlebois RL, Doolittle WF, Duguet M, Gaasterland T, Garrett RA, Ragan MA, Sensen CW, Van der Oost J (2001).** The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc Natl Acad Sci USA* 3: 7835-7840

**Simon R (1981).** Morphology and protein composition of gas vesicles from wild type and gas vacuole deficient strains of *Halobacterium salinarum* strain 5. *J Gen Microbiol* 125: 103-111

**Smith DR, Doucette-Stamm LA, Deloughery C, Lee H, Dubois J, Aldredge T, Bashirzadeh R, Blakely D, Cook R, Gilbert K, Harrison D, Hoang L, Keagle P, Lumm W, Pothier B, Qiu D, Spadafora R, Vicaire R, Wang Y, Wierzbowski J, Gibson R, Jiwani N, Caruso A, Bush D, Reeve JN, et al. (1997).** Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics. *J Bacteriol* 179: 7135-7155

**Soppa J (1999a).** Transcription initiation in Archaea: facts, factors and future aspects. *Mol Microbiol* 31: 1295-1305

**Soppa J (1999b).** Normalized nucleotide frequencies allow the definition of archaeal promoter elements for different archaeal groups and reveal base-specific TFB contacts upstream of the TATA box. *Mol Microbiol* 31: 1589-1592

**Southern EM (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 5: 503-517

**Stoeckenius W & Kunau WH (1968).** Further characterization of particulate fractions from lysed

cell envelopes of *Halobacterium halobium* and isolation of gas vacuole membrane. *J Cell Biol* 38: 337-357

**Takai Y, Sasaki T, Matozaki T (2001).** Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81: 153-209

**Thompson DK, Palmer JR, Daniels CJ (1999).** Expression and heat-responsive regulation of TFIIB homologue from the archaeon *Haloferax volcanii*. *Mol Microbiol* 33: 1081-1092

**Tindall BJ (1992).** The family Halobacteriaceae., in: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH, Ed., The Prokaryotes. Springer-Verlag, Berlin: 768-808

**Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354

**Ventosa A, Márquez MC, Garabito MJ, Arahál DR (1998).** Moderately halophilic gram-positive bacterial diversity in hypersaline environments. *Extremophiles* 2: 297-302

**Vogelstein B, Gillespie D (1979).** Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *PNAS* 76: 615-619

**Wagner G, Hartmann R, Oesterhelt D (1978).** Potassium uniport and ATP synthesis in *Halobacterium halobium*. *Eur J Biochem* 89: 169-179

**Walsby AE & Hayes P (1989).** Gas vesicle proteins. *Biochem J* 264: 313-322

**Walsby AE (1994).** Gas vesicles. *Microbiol Rev* 58: 94-144

**Werner F, Weinzierl ROJ (2002).** A recombinant RNA polymerase II-like enzyme capable of promoter-specific transcription. *Mol Cell* 10: 635-646

**Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985).** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 5: 103-119

**Zillig W, Stetter KO, Janekovic D (1979).** DNA-dependent RNA polymerase from the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Eur J Biochem* 96: 597-604

**Zimmermann P, Laska S, Kletzin A (1999).** Two modes of sulfite oxidation in the extremely thermophilic and acidophilic archaeon *Acidianus ambivalens*. *Arch Microbiol* 172: 76-82

**Zotzel J (1998).** Untersuchungen zur Regulation der Gasvesikelsynthese bei dem halophilen Archaeon *Haloferax mediterranei*: Gerichtete und zufällige Mutagenese des mutmaßlichen Transkriptionsrepressors mcGvpD. Diplomarbeit, TU Darmstadt

# Abkürzungen

A	Adenin in Nukleinsäuresequenzen, Alanin in Aminosäuresequenzen
Abb.	Abbildung
AMP, ADP, ATP	Adenosin-5'-monophosphat, -diphosphat, -triphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
<i>bgaH</i>	Betagalaktosidase-Gen aus <i>Hf. lucentensis</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin in Nukleinsäuresequenzen, Cystein in Aminosäuresequenzen
C-Terminus	Ende eines Polypeptids mit freier Carboxylgruppe
D	Asparaginsäure in Aminosäuresequenzen
Dig	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ex	Expression in pJAS35 unter der Kontrolle des <i>fdx</i> -Promotors
<i>fdx</i>	Ferredoxin-Gen
G	Guanin in Nukleinsäuresequenzen, Glycin in Aminosäuresequenzen
<i>gvp</i>	<i>gas vesicle protein</i> -Gen
Gvp	<i>gas vesicle protein</i>
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde(n)
<i>Hb.</i>	<i>Halobacterium</i>
<i>Hf.</i>	<i>Haloferax</i>
I	Isoleucin in Aminosäuresequenzen
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid
K	Lysin in Aminosäuresequenz
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton (= 1000 g/mol)
L	Leucin in Aminosäuresequenzen
M	Molar, Methionin in Aminosäuresequenzen
min	Minute(n)
mRNA	Protein-kodierende Ribonukleinsäure
mut	Gentechnisch verändertes Gen oder Protein
N	Asparagin in Aminosäuresequenzen
N-Terminus	Ende eines Polypeptids mit freier Aminogruppe
nt	Nukleotid(e)
NTA	<i>Nitrilotriacetic acid</i>
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte: Absorption von Licht der Wellenlänge 600 nm
ONPG	ortho-Nitrophenyl-β-D-galaktosid
P	Prolin in Aminosäuresequenzen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
R	Arginin in Aminosäuresequenzen
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
T	Thymin in Nukleinsäuresequenz, Threonin in Aminosäuresequenzen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität, definiert als Umsatz von 1 μmol Substrat pro min)
Upm	Umdrehungen pro Minute
Vac	Gasvesikelphänotyp
V	Valin in Aminosäuresequenzen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
Y	Tyrosin in Aminosäuresequenzen

# Anhang

## LEBENS LAUF

Name Peter Zimmermann

Geburtstag 23.09.1972

Geburtsort Pirmasens

Schul Ausbildung 1979-1983 Grundschule Johannes-Obernburger-Volksschule in Obernburg

1983-1992 Gymnasium Hermann-Staudinger-Gymnasium Erlenbach-Obernburg

1992 Abitur

Erwerbstätigkeit 1992-1993 CIBA Vision GmbH Großwallstadt

Akademische Ausbildung 1993-1998 Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt

1998 Diplomprüfung

1998 Diplomarbeit bei HD Dr. A. Kletzin an der Technischen Universität Darmstadt

1998-2003 Promotionsarbeit bei Frau Prof. Dr. F. Pfeifer an der Technischen Universität Darmstadt

# Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Frau Professor Dr. Felicitas Pfeifer an der Technischen Universität Darmstadt am Institut für Mikrobiologie und Genetik in der Zeit von September 1998 bis Februar 2003 angefertigt.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Weiterhin erkläre ich, dass ich bisher keinen Versuch unternommen habe, an einer deutschen oder ausländischen Universität zu promovieren.

Darmstadt, den 11.02.2003

(Peter Zimmermann)